

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

RÔMULO BRÊNNO LOPES FRÓES

**EFEITOS DA ESPERMIDINA SOBRE CAMUNDONGOS COM
DIABETES MELLITUS TIPO 2: O Papel Do Estresse Do
Retículo Endoplasmático**

São Luís
2024

RÔMULO BRÊNNO LOPES FRÓES

**EFEITOS DA ESPERMIDINA SOBRE CAMUNDONGOS COM
DIABETES MELLITUS TIPO 2: O Papel Do Estresse Do Retículo
Endoplasmático**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Maranhão,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Lucas Martins
França

São Luís
2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Fróes, Rômulo Brênno Lopes.

Efeitos da espermidina sobre camundongos com diabetes mellitus tipo 2: : o Papel do Estresse do Retículo Endoplasmático / Rômulo Brênno Lopes Fróes. - 2024.
118 f.

Orientador(a): Lucas Martins França.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2024.

1. Dieta Rica Em Sacarose. 2. Poliamina. 3. Fígado.
I. França, Lucas Martins. II. Título.

RÔMULO BRÊNNO LOPES FRÓES

**EFEITOS DA ESPERMIDINA SOBRE CAMUNDONGOS COM
DIABETES MELLITUS TIPO 2: O Papel Do Estresse Do Retículo
Endoplasmático**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Martins França

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lucas Martins França (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Camila de Fátima Carvalho Brito
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Karla Frida Torres Flister
Universidade Federal do Maranhão

“Não é na ciência que está a felicidade, mas na aquisição da ciência”
Edgar Allan Poe

Dedico à minha família.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta dissertação é resultado de uma jornada marcada por desafios, aprendizados e apoio inestimável de muitas pessoas que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Lucas Martins França, pelo suporte acadêmico, pela orientação incansável e pela confiança em minha capacidade de conduzir este projeto. Suas orientações, críticas construtivas e incentivo constante foram essenciais para que eu pudesse alcançar este resultado. Também não posso deixar de agradecer ao Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes que permitiu que eu ingressasse na ciência lá na graduação. Sem esse apoio e incentivo, esta realização não seria possível.

Gostaria de agradecer à minha família. Sou profundamente grato por seu amor e apoio incondicional. Em especial, dedico um agradecimento aos meus pais José Domingos Lopes Fróes e Vera Lucia Lopes Fróes por sempre acreditarem em mim e me incentivarem em todas as decisões e ao meu irmão Rênnisson Willgner Lopes Fróes pelo companheirismo.

Gostaria de agradecer também aos colegas do laboratório, Odara Champoudry, Thamys Marinho, Perla Lopes, Camila Brito, Jaqueline Ponte, Fernanda Lima, Eduardo Moscoso, Débora Gomes, Rafael Ribeiro e Maysa Alencar por criarem um ambiente colaborativo e inspirador, onde pude compartilhar conhecimentos e aprender continuamente. Obrigado pela amizade, pelo apoio na execução de diversos protocolos e pelas discussões enriquecedoras que contribuíram para a evolução do meu trabalho.

Um agradecimento especial aos professores Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto e Karla Frida Torres Flister, que proporcionaram um suporte essencial para o desenvolvimento da minha pesquisa, disponibilizando recursos, conhecimentos e orientações sempre que necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelo suporte, prontidão e conhecimentos que agregaram bastante a este trabalho.

Aos meus amigos Marcus Barros, Viviane Alcobaça, Ilsimar Júnior e Lorena Leslye pelo apoio e momentos de confraternização.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a todos os participantes que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta jornada se tornasse não só um desafio acadêmico, mas uma experiência de vida enriquecedora e transformadora.

RESUMO

A poliamina espermidina (ESP) é usada pela população como suplementação anti-idade e, experimentalmente, melhora o metabolismo energético em alguns modelos animais de obesidade. Entretanto, seu efeito em modelos experimentais de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) induzido por sacarose e seus mecanismos de ação ainda não foram avaliados. Além disso, a sua farmacologia oral é pouco estudada. Assim, este trabalho tem dois objetivos: 1 - investigar, *in silico*, os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos da ESP; 2 - analisar os efeitos da ESP em camundongos com DM2 induzidos por dieta rica em sacarose (DRS). Os ensaios *in silico* foram realizados com os softwares SWISSADME, PROTOX-II, SWISSTargetPrediction e Pass para avaliação, respectivamente, das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas da ESP. No estudo *in vivo*, camundongos fêmeas pós-desmame foram divididos em três grupos: grupo controle (CTR; n= 7) alimentado com dieta padrão e grupos DRS (n=7) e DRS/ESP (n=7) que receberam solução de sacarose 30% por 20 semanas. A partir da 12ª semana, o grupo DRS/ESP recebeu ESP por via oral na dose de 20 mg/kg, enquanto os demais grupos receberam água. O tratamento durou 8 semanas, com monitoramento de peso, consumo alimentar, glicemia e teste de tolerância à glicose (TTG). Posteriormente, os animais foram eutanasiados, amostras de sangue foram coletadas para análises bioquímicas e de resistência à insulina. Amostras de fígado foram coletadas para avaliação dos lipídeos hepáticos, histologia e expressão proteica de marcadores do retículo endoplasmático (RE). Amostras de tecidos adiposos marrom (TAB) e brancos foram coletadas para morfometria. Ademais, o tecido adiposo perigonadal (TAP) foi utilizado para ensaios de lipólise. Todos os dados foram representados como média $\pm$ e.p.m e as diferenças foram analisadas por ANOVA ($p < 0,05$). A ESP demonstrou possuir uma boa biodisponibilidade oral, com escore de biodisponibilidade igual a 0,55 e resultados satisfatórios de acordo com os parâmetros de Lipinski, Veber e Egan. Quanto ao comportamento farmacocinético, a ESP apresentou uma alta absorção pelo trato gastrointestinal, não penetrar pela barreira hematoencefálica, não ser substrato de glicoproteína P, bem como não inibiu nenhuma das principais enzimas do citocromo P450. Em relação aos parâmetros toxicocinéticos, a dose letal da ESP foi de 820 mg/kg e ela se apresentou inativa quanto aos parâmetros de hepatotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade e mutagenicidade. Em relação a abordagem experimental, a exposição contínua à sacarose aumentou a massa corpórea dos animais quando comparados ao CTR, que é explicado pelo aumento do consumo energético. Este maior aporte energético aumentou os depósitos de gordura retroperitoneal, mesentérica e perigonadal. Os animais DRS e DRS/ESP também apresentaram aumentos da glicemia, triglicérides (TG) séricos e das gorduras e TG hepáticos. A atividade lipolítica do TAP do grupo DRS foi prejudicada em todas as condições: basal, com estímulo adrenérgico e com inibição insulínica. ESP aumentou o TAM, reduziu os níveis de TG séricos e melhorou a homeostase glicídica pelo TTG e a resistência insulínica pelo índice TyG. Na análise histológica, ESP reduziu a esteato-hepatite induzidos pela dieta. A análise da expressão proteica demonstra que a ESP consegue reestabelecer os níveis normais da GRP78, PDI e ATF4, proteínas chaves na manutenção da homeostase do RE. Portanto, a ESP foi capaz de melhorar o metabolismo glicolipídico de camundongos com DM2 que pode ser explicado pela restauração da homeostase do RE no fígado. Além disso, possui características farmacocinéticas e toxicológicas que fazem dela um fármaco em potencial para o tratamento dessa desordem por via oral.

Palavras-Chaves: Espermidina; Diabetes Mellitus Tipo 2; Reticulo endoplasmático, Dieta rica em sacarose.

ABSTRACT

Polyamine spermidine (SPD) is used by the population as an anti-aging supplement and, experimentally, improves energy metabolism in some animal models of obesity. However, its effect on experimental models of sucrose-induced Type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its mechanisms has not yet been evaluated. Additionally, its oral pharmacology is poorly studied. Thus, this study has two objectives: 1 - to investigate, *in silico*, the pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of SPD; 2 - to analyze the effects of SPD in mice with T2DM induced by a high-sucrose diet (HSD). The *in-silico* assays were performed using the software SWISSADME, PROTOX-II, SWISSTargetPrediction, and Pass to evaluate, respectively, the physicochemical, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and toxicological properties of SPD. In the *in vivo* study, post-weaning female mice were divided into three groups: control group (CTR; n=7) fed with standard diet and DRS (n=7) and DRS/ESP (n=7) groups that received 30% sucrose solution for 20 weeks. From the 12th week onwards, the DRS/ESP group received 20 mg/kg of oral SPD, while the other groups received water. Treatment lasted 8 weeks, with monitoring of weight, food intake, blood glucose and glucose tolerance test (GTT). Subsequently, the animals were euthanized, blood samples were collected for biochemical and insulin resistance analyses. Liver samples were collected for evaluation of hepatic lipids, histology and protein expression of endoplasmic reticulum (ER) markers. Samples of brown (BAT) and white adipose tissue were collected for morphometry. Moreover, samples of perigonadal adipose tissue (PAT) were using lipolysis assays. All data were represented as mean $\pm$ s.e.m and differences were demonstrated by ANOVA ($p < 0.05$). SPD demonstrated to have a good oral bioavailability, with a bioavailability score equal to 0.55 and satisfactory results according to the Lipinski, Veber and Egan parameters. Regarding pharmacokinetic behavior, SPD showed high absorption by the gastrointestinal tract, does not penetrate the blood-brain barrier, not being a substrate for glycoprotein P, and not inhibiting any of the main cytochrome P450 enzymes. About toxicokinetic settings, the lethal dose of SPD was 820 mg/kg, and it was inactive for hepatotoxicity, carcinogenicity, immunotoxicity and mutagenicity parameters. Regarding the experimental approach, continuous exposure to sucrose increased the body mass of animals when compared to CTR, which is explained by the increase in energy consumption. This greater energy intake increased retroperitoneal, mesenteric, and perigonadal fat deposits. DRS and DRS/ESP animals also showed an increase in glycaemia, serum triglycerides (TG) and hepatic total fat and TG. The lipolytic activity of the PAT of animals exposed to sucrose was impaired under all conditions: basal, with adrenergic stimulation and with insulin inhibition. ESP increased the BAT and improved serum TG, glucose homeostasis by TTG and insulin resistance by TyG index. In the histological analysis, ESP reduced sucrose-induced steatohepatitis. This effect must be due to the restoration of protein expressions of hepatic GRP78, PDI and ATF4, key proteins in the maintenance of ER homeostasis. Therefore, ESP was able to improve the glycolipid metabolism of mice with T2DM that can be explained by restoration of hepatic ER homeostasis. In addition, it has pharmacokinetic and toxicological characteristics that make it a potential drug for the treatment of this disorder by oral route.

Keywords: Spermidine; Type 2 Diabetes Mellitus; Endoplasmic reticulum, High-sucrose diet.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATF6	<i>activating transcription factor 6</i>
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
CTR	Controle
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNL	Lipogênese <i>de novo</i>
DRS	Dieta rica em sacarose
EPM	Média $\pm$ erro padrão das médias
ESP	Espermidina
GRP78	<i>Glucose-regulated proteins 78</i>
GRP94	<i>Glucose-regulated proteins 94</i>
GTT	Teste de tolerância à glicose
i.p.	Via intraperitoneal
IRE1	<i>inositol-requiring 1</i>
ITT	Teste de tolerância à insulina
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
PA	Poliamina
PDI	<i>Proteins disulfide isomerase</i>
PERK	<i>eukaryotic translation initiation factor 2-α-kinase</i>
PUT	Putrescina
RE	Retículo Endoplasmático
RI	Resistência Insulínica
SPE	Espermina
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
v.o	Via oral
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade

LISTA DE FÍGURAS

- Figura 1. Tendências na prevalência ajustada por idade de DM2 em diferentes regiões do mundo de 1990 a 2019.** Prevalência ajustada por idade de DM2 em diferentes regiões do mundo em 1990 (barras azuis), 200 (barras vermelhas), 2010 (barras verdes) e 2019 (barras amarelas). O painel superior mostra dados para mulheres e o painel inferior mostra dados para homens. Fonte: TINAJERO; MALIK, 2021 15
- Figura 2. Vias de sinalização envolvidas na secreção de insulina em células β em condições fisiológicas.** A liberação de insulina ocorre principalmente em resposta a níveis elevados de glicose, que é absorvida pela célula por meio do transportador GLUT2. O metabolismo da glicose aumenta a relação ATP/ADP, o que provoca o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP, resultando na despolarização da membrana e na ativação dos canais de cálcio controlados por voltagem. O influxo de cálcio que ocorre a seguir desencadeia a exocitose da insulina. Além disso, canais como P2X, P2Y, SERCA e RYR também desempenham um papel na mobilização do cálcio e na secreção de insulina. Fonte:Galicia-Garcia et al., 2020 (Adaptado). Criado com BioRender®..... 17
- Figura 3. Mecanismos que levam a disfunção de células beta.** A hiperglicemia e a hiperlipidemia causam estresse oxidativo, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que bloqueiam a mobilização de cálcio e desencadeiam sinais pró-apoptóticos. O excesso de ácidos graxos livres e os altos níveis de glicose ativam as vias apoptóticas da resposta a proteína mal não dobrada (RPD), gerando estresse no retículo endoplasmático. A glicose elevada por longos períodos também aumenta a produção de pró insulina, contribuindo para a formação de EROs. . Fonte:Galicia-Garcia et al., 2020 (Adaptado). Criado com BioRender®..... 22
- Figura 4. Mecanismos que ligam DHGNA e DM2.** Interação entre fígado, tecido adiposo e pâncreas na fisiopatologia da resistência insulínica e da disfunção hepática induzida pelo consumo excessivo de açúcar. Dietas ricas em açúcares (DRS) simples estimulam, inicialmente, a lipólise do tecido adiposo, levando ao aumento de ácidos graxos livres na circulação, que são captados pelo fígado, contribuindo para o aumento da síntese de triglicerídeos, ativação de proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico, como SREBP1c e ChREBP, e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As DRS também estimulam lipogênese de novo no fígado através do ChREBP e SREBP1c. Todas essas alterações promovem lipotoxicidade, resistência insulínica hepática e gliconeogênese, exacerbando a produção de glicose e o acúmulo de ceramidas e diacilgliceróis no fígado. Esse processo contribui para a progressão de doenças hepáticas, como esteatose, esteato-hepatite e cirrose hepática. No pâncreas, ocorre disfunção das células β , agravando o quadro de resistência insulínica e favorecendo o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2. Fonte: Tanase et al., 2020 (Adaptado)..... 26
- Figura 5. As vias de sinalização da RPD.** As vias de sinalização da RPD começam quando há uma falha no dobramento de proteínas no lúmen do retículo endoplasmático (RE), o que resulta no acúmulo de proteínas não dobradas, gerando o estresse no RE. Para tentar restaurar o equilíbrio, uma série de processos adaptativos é ativada. O primeiro mecanismo de defesa envolve o chaperonamento correto dessas proteínas defeituosas por várias chaperonas, com destaque para a GRP78 (ou BiP). Se as proteínas não forem corrigidas, são direcionadas para o centro de degradação associada ao RE (ERAD), um processo no qual as proteínas não dobradas são retrafegadas para o citosol, poliubiquitinadas e degradadas pelos proteassomos. Ao mesmo tempo, a resposta à proteínas é acionada com a ativação de três sensores transmembranares: IRE1, PERK e ATF6. A ativação de cada um desses sensores acontece quando a GRP78 se dissocia deles para ajudar no dobramento proteico. ATF6, uma vez liberado, é transportado ao Aparelho de Golgi, onde é clivado, liberando um fragmento que entra no núcleo e a expressão de genes específicos. IRE1 se dimeriza e autofosforila, ativação

sua função de RNase, que edita o mRNA XBP1, transformando-o em XBP1s, um fator de transcrição que também se dirige ao núcleo. Além disso, IRE1 degrada mRNAs defeituosos por meio do processo RIDD. Já a PERK, após ativação, fosforila o eIF2 α , reduzindo a tradução proteica global e ativando o fator de transcrição ATF4. PERK também pode fosforilar o nRF2, um regulador da resposta antioxidante. Juntos, ATF6f, XBP1s, nRF2 e ATF4 promovem a expressão de genes que aumentam a produção de chaperonas, componentes do ERAD, melhoram o controle de qualidade do RE, estimulam a autofagia, a defesa antioxidante e outros processos que garantem a homeostase celular. Fonte: Pinto et al., 2018 (Adaptado) 30

Figura 6. Vias apoptóticas associadas ao estresse do RE. As vias de apoptose relacionadas ao estresse do retículo endoplasmático (RE) ocorrem quando o estresse crônico do RE faz a sinalização adaptativa da RPD mudar para um estado pró-apoptótico. Nesse processo, a IRE-1 α também degrada mRNAs de proteínas responsáveis pelo dobramento correto através do mecanismo RIDD, além de induzir a expressão de TXNIP, uma proteína pró-oxidante que ativa os inflamassomas. A sinalização via ATF4 e ATF6 estimula a superexpressão do fator de transcrição CHOP, que suprime Bcl-2 e aumenta a produção de fatores pró-apoptótico da família BH3, como BIM, PUMA e NOXA, além de BAX e BAK. CHOP também eleva os níveis de GADD35, o que desfosforila o eIF2 α e estimula a produção de espécies reativas de oxigênio mitocôndrias. Além disso, a proteína tumoral p53 auxilia na ativação desses fatores apoptóticos. Nas mitocôndrias, essa cascata de sinais apoptóticos cria um ambiente oxidativo mediado por EROS, provoca a liberação de citocromo C e interrompe a homeostase do cálcio, levando à ativação da via de apoptose regulada por caspases e à morte celular programada. Fonte: Pinto et al., 2018 (Adaptado). 32

Figura 7. Estresse do retículo endoplasmático (RE) e a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). O acúmulo de lipídios no hepatócito decorrente da obesidade ou de dietas lipogênicas promove modificações na composição da membrana do RE aumentando a razão fosfatidilcolona (FC):fosfatidietanolamina (FE), o que induz estresse do RE por alterações na homeostase do Ca²⁺. A ativação da resposta a proteína desdobrada (RPD) tenta amenizar o acúmulo de gordura, mas se a sobrecarga lipídica não for diminuída, o estresse do RE torna o processo um ciclo vicioso por estimular lipogênese de novo. Isso contribui para a manutenção e progressão da DHGNA, o que pode evoluir para a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), caso esse ciclo não seja interrompido. Criado com Biorender 41

Figura 8. Estrutura (a) e estereoestrutura (b) da espermidina. Fonte: Zou et al., 2022. .. 45

Figura 9. Desenho Experimental 67

Figura 10. Parâmetros morfométricos. A, peso dos animais (g); B, Índice de Lee (g1/3/cm x1000); C, consumo energético (Kcal/10g/semana); D, área sobre a curva do consumo energético. Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; n = 7); ração padrão e solução de sacarose; ração padrão e solução de sacarose (DRS; n = 7); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; n = 7). Pontos e barras representam média + SEM (One-Way ANOVA, Tukey). “a” significa p<0,05 quando comparado ao CTR; “b” significa p<0,05 quando comparado ao grupo DRS. 71

Figura 11. Depósitos de tecido adiposo. A, tecido adiposo branco retroperitoneal (g/10 g de massa corporal); B, tecido adiposo branco periovariano (g/10 g de massa corporal); C, tecido adiposo branco mesentérico (g/10 g de massa corporal); D, tecido adiposo marrom subescapular (g/10 g de massa corporal). Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; n = 7); ração padrão e solução de sacarose (DRS; n = 7); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; n = 7). Pontos e barras representam média + SEM (One-Way ANOVA, Tukey). “a” significa p<0,05 quando comparado ao CTR; “b” significa p<0,05 quando comparado ao grupo DRS. 72

Figura 12. Parâmetros bioquímicos séricos. A, Triglicerídeos sérico (mg/dl); B, colesterol sérico (mg/dl). Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; n = 7); ração padrão

e solução de sacarose; ração padrão e solução de sacarose (DRS; n = 7); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; n = 7). Pontos e barras representam média + SEM (One-Way ANOVA, Tukey). “a” significa $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; “b” significa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DRS. 73

Figura 13. Parâmetros glicêmicos. A, glicemia em jejum antes do tratamento com espermidina (mg/dl); B, glicemia em jejum após o tratamento com espermidina; C, níveis glicêmicos no teste intraperitoneal de tolerância a glicose (mg/dl); D, área sobre a curva do teste intraperitoneal de tolerância a glicose; E, índice TyG. Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; n = 7); ração padrão e solução de sacarose; ração padrão e solução de sacarose (DRS; n = 7); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; n = 7). Pontos e barras representam média + SEM (One-Way ANOVA, Tukey). “a” significa $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; “b” significa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DRS. 74

Figura 14. Lipólise ex vivo do tecido adiposo branco periovariano. A, Taxa de liberação de glicerol sob condições basais ($\mu\text{g}/\text{mg}/\text{h}$); B, Taxa de liberação de glicerol em condição estimulada por isoproterenol ($\mu\text{g}/\text{mg}/\text{h}$); C, Taxa de liberação de glicerol em condição inibida por insulina ($\mu\text{g}/\text{mg}/\text{h}$). Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; n = 7); ração padrão e solução de sacarose; ração padrão e solução de sacarose (DRS; n = 7); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; n = 7). Pontos e barras representam média + SEM (One-Way ANOVA, Tukey). “a” significa $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; “b” significa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DRS. 75

Figura 15. Parâmetros hepáticos. A, Peso do fígado (g/10g de massa corporal); B, Gordura hepática total (mg/g de fígado); C, triglicerídeos hepáticos (mg/g de fígado); D, colesterol hepático (mg/g de fígado). Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; n = 7); ração padrão e solução de sacarose; ração padrão e solução de sacarose (DRS; n = 7); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; n = 7). Pontos e barras representam média + SEM (One-Way ANOVA, Tukey). “a” significa $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; “b” significa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DRS. 76

Figura 16. Análise histológica de fígados após tratamento com espermidina. Seções de amostras de fígado coradas com hematoxilina e eosina para visualização das morfologias dos hepatócitos. Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; n = 7); ração padrão e solução de sacarose; ração padrão e solução de sacarose (DRS; n = 7); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; n = 7)..... 77

Figura 17. Expressão proteica dos marcadores do estresse do retículo endoplasmático. Expressões proteicas relativas a marcadores envolvidos na sinalização adaptativa da RPD (GRP78, PDI, ATF4) e pró-apoptótica (CHOP) avaliadas no fígado de camundongos alimentados com ração padrão (CTR, n=7), dieta rica em sacarose (DRS, n=7) e tratados com espermidina (DRS/ESP, n=7). As proteínas são expressas como uma densidade relativa normalizada pela anti β -actina. As imagens de manchas são representativas daquelas encontradas nos géis de corpo. As barras representam média $\pm$ erro padrão da média avaliadas por ANOVA considerando “a” como diferente significativamente do CTR. 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da espermidina por análise in silico.	54
Tabela 2. Estimativa da biodisponibilidade oral da espermidina	54
Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos da espermidina	55
Tabela 4. Predição de toxicidade da espermidina.	55
Tabela 5. Previsão in silico dos espectros de atividade biológica da espermidina. “Pa” refere-se a maior potencial de atividade; “Pi” refere-se ao menor potencial de atividade.	56
Tabela 6. Previsão dos alvos moleculares da espermidina in silico	57
Tabela 7. Score de atividade de doença hepática gordurosa não-alcoolica.	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2).....	13
2.1.1 Definição e Características Clínicas do DM2.....	13
2.1.2 Fisiopatologia do DM2.....	16
2.1.3 Complicações e Impacto na Saúde do DM2.....	20
2.1.4 Doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) no DM2.....	24
2.2 Estresse do Retículo Endoplasmático (RE).....	26
2.2.1 Definição e Funções do Retículo Endoplasmático	26
2.2.2 Mecanismos de Estresse do Retículo Endoplasmático	27
2.2.3 Estresse do RE no Contexto do DM2.....	32
2.2.4 Relevância do Estresse do RE na DHGNA	40
2.2.5 Modulação do Estresse do RE como Abordagem Terapêutica.....	42
2.3 Poliaminas e Espermidina	43
2.3.1 Introdução às Poliaminas.....	43
2.3.2 Funções e Importância da Espermidina.....	44
2.3.3 Espermidina e Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2).....	48
3 OBJETIVOS	50
3.1 Objetivo Geral.....	50
3.2 Objetivos Específicos.....	50
4 RESULTADOS	51
4.1 Capítulo I – Avaliação Farmacológica e Toxicológica da Espermidina: uma abordagem <i>in silico</i>	51
4.1.1 Introdução.....	51
4.1.2 Material e Métodos	52
4.1.3 Resultados.....	53
4.1.4 Discussão	58
4.1.5 Conclusão	63
4.2 Capítulo II – Espermidina melhora o perfil glicolipídico de camundongos fêmeas diabéticas: o papel do estresse do retículo endoplasmático hepático	64
4.2.1 Introdução.....	64
4.2.2 Material e Métodos	65
4.2.3 Resultados.....	70
4.2.4 Discussão	80
4.2.5 Conclusão	85
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
REFERÊNCIAS	88
ANEXO A	113

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é a terceira maior causa de morte no mundo. De acordo com dados atualizados do Atlas de Diabetes da *International Diabetes Federation* (IDF) (2022), estima-se que existem 536,6 milhões de pessoas no mundo com diabetes. O Brasil é o sexto país com maior número de pessoas com a doença totalizando 15,7 milhões de pessoas (Sun *et al.*, 2022). O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) corresponde a cerca 95% de todos os casos de DM. O DM2 é caracterizado por uma hiperglicemia de jejum crônica resultante de um prejuízo da sensibilidade à insulina, denominado resistência insulínica (RI), que pode progredir para deficiência na secreção de insulina pelas células β pancreáticas (Roden; Shulman, 2019).

O desenvolvimento da RI está associado principalmente a fatores ambientais como o sedentarismo e má hábitos alimentares (Tanase *et al.*, 2020). O consumo de açúcares de adição (ex.: sacarose e frutose) tem sido uma das principais causas da maior prevalência do DM2 (Paglia, 2019). Estudos do nosso grupo demonstraram que a exposição a uma dieta sólida rica em sacarose (DRS) é capaz de induzir esteatose hepática e alterar a homeostase da glicose, porém com níveis glicêmicos pré-diabéticos (Flister *et al.*, 2018; França *et al.*, 2020; Tanase *et al.*, 2020)

Na última década, o estresse do RE tem apresentado papel chave para a manutenção dessa patologia. O retículo endoplasmático (RE) é uma organela responsável pela síntese de quase todas as proteínas secretadas e pelo controle de uma ampla gama de processos celulares, como organogênese, atividade transcricional, mecanismos redox e apoptose (Qi; Chen, 2019). Sendo extremamente sensível a alterações na homeostase energética, o maior aporte nutricional pode induzir à formação de proteínas mal dobradas e sem função no lúmen do RE o que desencadeia o estresse do retículo endoplasmático (ERE) e a resposta a proteína desdobrada (RPD) (Hetz *et al.*, 2020; Qi; Chen, 2019)

As evidências atuais sugerem que a hiperglicemia aguda e crônica relacionadas ao DM2 interrompem a homeostase do RE, resultando na ativação irreversível da RPD (Mustapha *et al.*, 2021). O ERE ocorre quando a demanda por dobramento de proteínas excede a capacidade de dobramento do RE. Como células secretoras especializadas, as células β pancreáticas têm um RE bem desenvolvido e vários mecanismos para lidar com a enorme demanda por dobramento de proteínas de insulina. No entanto, o aumento da demanda de insulina durante a resistência à insulina presente nos quadros de DM2 cria um aumento da demanda sintética nas células β , desencadeando assim o ERE (Kulkarni *et al.*, 2023). Da mesma forma o fígado é sobrecarregado pelo maior aporte nutricional e lipogênese *de novo* induzido pela insulina

aumentando o transporte hepático de glicose e a síntese e exportação de lipídeos. Essa condição também leva ao acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do RE e, consequentemente, seu estresse. Nesse contexto, se inicia um ciclo vicioso, pois esse ERE vai contribuir para progressão do acúmulo de gordura no fígado que pode levar ao desenvolvimento da Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) (Flessa *et al.*, 2022).

Uma das alternativas do RE para reestabelecer a homeostase em situações de estresse é a maior produção de chaperonas. Alguns estudos têm demonstrado que a administração de chaperonas químicas ou substâncias com essa propriedade podem melhorar a sensibilidade insulínica em modelos experimentais de diabetes (Mulyani *et al.*, 2020). Atualmente, a patogênese DM2 ainda não é completamente compreendida e não existem medicamentos específicos capazes de curá-lo. Por isso, a busca por intervenções, sejam elas farmacológicas ou não, que possam mitigar as características patológicas dessa condição é uma questão crucial que precisa ser enfrentada (Chen *et al.*, 2024). Nesse contexto, a poliamina natural espermidina (ESP) pode se destacar, uma vez que ela apresenta propriedade semelhantes à chaperona e é abundante na natureza, pois é conservada evolutivamente desde de leveduras até animais (Singh *et al.*, 2017).

A ESP é considerada uma substância anti-idade e mimético de restrição calórica, pois apresenta propriedades autofágicas em diferentes modelos de organismos, incluindo camundongos (Madeo *et al.*, 2020a). Além disso, não existem estudos avaliando o efeito dessa substância tanto em animais alimentados com DRS como com DM2. Em vista disso, considerando que a ESP apresenta relações com o enovelamento proteico e que a RPM é um dos mecanismos responsáveis pela progressão do DM2 e da DHGNA, este trabalho é relevante, pois avalia a parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos da ESP além de apresentá-la como potencial terapêutico na melhora dos parâmetros glicolipídicos em casos de DM2 e DHGNA.

Consequentemente, a hipótese deste trabalho é que a ESP apresenta boas propriedades farmacocinéticas e baixa toxicidade o que possibilita que o seu uso por via oral em camundongos com DM2 seja capaz de melhorar as alterações glicolipídicas através da mitigação do ERE desses animais. Essa dissertação é dividida em dois capítulos: no primeiro capítulo intitulado “Avaliação físico-química, farmacocinética e toxicológica da espermidina: um estudo *in silico*” são apresentados os parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos da ESP avaliados por programas computacionais. No segundo capítulo intitulado “Espermidina melhora o perfil glicolipídico de camundongos fêmeas diabéticos: o papel do estresse do retículo endoplasmático hepático” apresenta a avaliação do efeito do tratamento oral com espermidina em camundongos diabéticos induzidos com dieta rica em sacarose líquida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Para fundamentar essa hipótese e os estudos apresentados, é essencial revisar a literatura existente que relaciona o diabetes mellitus tipo 2, doença hepática gordurosa não-alcoólica e o estresse do retículo endoplasmático, além do potencial terapêutico da espermidina. No referencial teórico a seguir, serão explorados os conhecimentos atuais sobre esses tópicos, fornecendo uma base sólida para a compreensão dos mecanismos propostos e justificando a importância da investigação realizada nesta dissertação.

2.1 Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)

2.1.1 Definição e Características Clínicas do DM2

O diabetes mellitus é um distúrbio metabólico causado pela falta da secreção de insulina, ação prejudicada da insulina ou ambos. A insulina desempenha um papel importante como hormônio anabólico, afetando o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. As anormalidades associadas ao diabetes afetam principalmente tecidos como tecido adiposo, músculos esqueléticos e fígado devido à resistência à insulina. A gravidade dos sintomas pode variar dependendo da duração e do tipo de diabetes. Indivíduos com altos níveis de açúcar no sangue, particularmente aqueles com completa falta de insulina, podem apresentar sintomas como aumento do apetite, polidipsia, disúria, perda de peso e problemas de visão. Algumas pessoas com diabetes podem não apresentar nenhum sintoma, especialmente pacientes diabéticos tipo 2 em seus estágios iniciais. Sem tratamento adequado, o diabetes não controlado pode levar a várias complicações, como coma, confusão e, em casos raros, morte por cetoacidose ou síndrome hiperosmolar não cetótica não tratada (Antar *et al.*, 2023).

O diabetes pode ser classificado em quatro tipos principais: diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2, diabetes gestacional e diabetes secundário ou outros tipos específicos de diabetes. O diabetes mellitus 1 representa aproximadamente 5% de todos os casos diabetes e é caracterizado por um ataque autoimune às células β pancreáticas, resultando em deficiência grave de insulina. O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é causada pela combinação de resistência à insulina, em grande parte devido à obesidade e secreção deficiente de insulina. O diabetes gestacional, como o nome indica, refere-se ao diabetes diagnosticado durante a gravidez. A quarta categoria de diabetes denomina-se como secundária ou outros tipos específicos de diabetes. As principais categorias são defeitos monogênicos da função das células β , defeitos

genéticos da ação da insulina, doença pancreática exócrina, endocrinopatias, síndromes imunomediadas e genéticas induzidas por drogas ou produtos químicos e doenças infecciosas e incomuns associadas ao diabetes (Genuth *et al.*, 2021).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o diabetes mellitus é uma doença crônica e metabólica caracterizada por níveis elevados de glicose no sangue, o que leva ao longo do tempo a danos ao coração, vasculatura, olhos, rins e nervos. Mais de 90 % dos casos de diabetes mellitus são do tipo 2, uma condição marcada por secreção deficiente de insulina pelas células β pancreáticas, resistência à insulina (RI) e uma resposta secretora de insulina compensatória inadequada. A progressão da doença torna a secreção de insulina incapaz de manter a homeostase de glicose, produzindo hiperglicemia. Os pacientes com DM2 caracterizam-se, em sua maioria, por serem obesos ou apresentarem maior percentual de gordura corporal distribuídos predominantemente na região abdominal. Nessa condição, o tecido adiposo promove a RI por meio de vários mecanismos inflamatórios, incluindo aumento da liberação de ácidos graxos livres (AGL) e desregulação de adipocinas. Os principais impulsionadores da epidemia de DM2 são o aumento global da obesidade, estilos de vida sedentários, dietas hipercalóricas e envelhecimento populacional, que quadruplicaram a incidência e prevalência de DM2 (Galicia-Garcia *et al.*, 2020).

Com sua prevalência crescente em todo o mundo, o DM2 tornou-se uma das principais causas de morbidade e mortalidade, afetando milhões de pessoas globalmente. Dados epidemiológicos mostram que o diabetes atingiu proporções epidêmicas, com sua prevalência aumentando em todas as regiões do mundo durante as últimas 3 décadas. De acordo com dados do Global Burden of Disease (GBD), a prevalência global padronizada por idade de DM2 foi de aproximadamente 6,0% em homens e 5,0% em mulheres em 2019, refletindo um aumento considerável desde 1990, quando foi estimada em 3,9% em homens e 3,5% em mulheres. A incidência de DM2 aumenta com a idade, e estimativas globais combinadas sugerem que ela ocorre mais comumente entre 50 e 55 anos em média, manifestando-se um pouco mais cedo em homens do que mulheres. Não foram observadas grandes mudanças na distribuição etária global da incidência ou prevalência de DM2 durante as últimas 3 décadas; no entanto, com o aumento da epidemia de obesidade, espera-se que ocorram aumentos no número de casos de DM2 entre faixas etárias mais jovens. Os dados publicados mais recentemente pela Federação Internacional do Diabetes (IDF) estimaram que, até 2045, o número de pessoas afetadas pelo DM2 em todo o mundo aumentará para 700 milhões (Tinajero; Malik, 2021).

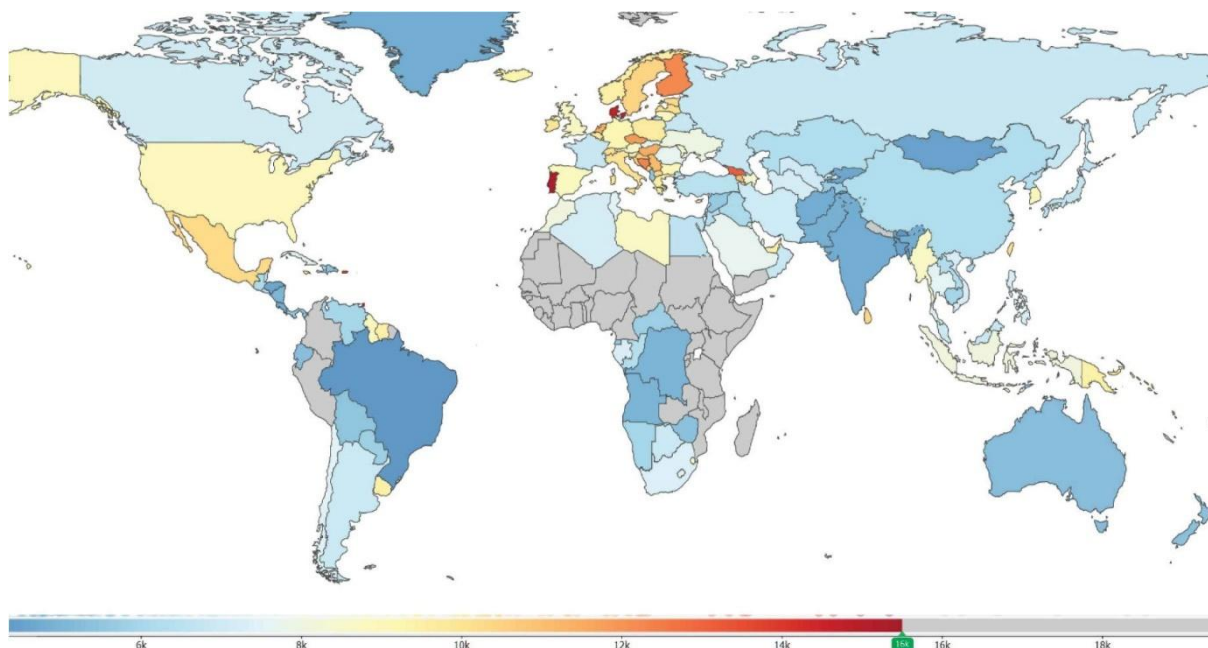


Figura 1. Tendências na prevalência ajustada por idade de DM2 em diferentes regiões do mundo de 1990 a 2019. Prevalência ajustada por idade de DM2 em diferentes regiões do mundo em 1990 (barras azuis), 200 (barras vermelhas), 2010 (barras verdes) e 2019 (barras amarelas). O painel superior mostra dados para mulheres e o painel inferior mostra dados para homens. Fonte: TINAJERO; MALIK, 2021

Uma análise baseada na Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) de 2013, conduzida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), revelou que a incidência de diabetes aumentou com o envelhecimento da população, afetando aproximadamente 20% das pessoas com idades entre 65 e 74 anos e 75 anos ou mais, totalizando mais de 3,5 milhões de indivíduos. De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), em 2019, mais de 12 milhões de brasileiros viviam com diabetes mellitus. Quando se compara entre os sexos, os homens representam 5,4%, o que equivale a 3,6 milhões de brasileiros. (Vieira *et al.*, 2024).

Os pacientes com DM enfrentam um alto risco de desenvolver comorbidades crônicas e complicações secundárias, tais como neuropatia, retinopatia, nefropatia e doenças cardiovasculares. Esse cenário não apenas impacta a saúde dos indivíduos, mas também acarreta um significativo ônus econômico estimado em US\$ 327 bilhões, conforme dados da American Diabetes Association (Barreto *et al.*, 2024). Acredita-se que o DM2 se desenvolve a partir de uma interação entre vários fatores de risco de estilo de vida, condição médica, fatores hereditários, psicossociais e demográficos, como alto nível de ácido úrico, qualidade/quantidade do sono, tabagismo, depressão, doença cardiovascular, dislipidemias, hipertensão, envelhecimento, etnia, histórico familiar de diabetes, sedentarismo e obesidade.

No DM2, a deficiência relativa de insulina devido à disfunção de células β pancreáticas é um fator chave para o desenvolvimento da doença. Obesidade, dietas “ocidentais” densas em

energia, idade avançada e estilo de vida sedentário são os principais fatores de risco para DM2. Esses fatores de risco podem precipitar tanto a falência de células β quanto a resistência à insulina. A resistência à insulina, uma das principais características do DM2, leva a uma série de alterações metabólicas que exacerbam a hiperglicemia. Para entender melhor essas alterações, é fundamental examinar os mecanismos fisiopatológicos que sustentam o desenvolvimento e a progressão do DM2 (Eizirik *et al.*, 2020).

2.1.2 Fisiopatologia do DM2

As células β são encarregadas da produção de insulina, inicialmente sintetizada na forma de pré-pró-insulina. Durante o processo de maturação, essa molécula sofre alterações estruturais no retículo endoplasmático (RE), com a participação de várias proteínas, resultando na formação de pró-insulina (Bunney *et al.*, 2017). Posteriormente, a pró-insulina é transportada do RE para o Complexo de Golgi (CG), onde é incorporada em vesículas secretoras imaturas e, então, clivada em peptídeo C e insulina (Fu *et al.*, 2013; Halban, 1994).

Após amadurecer, a insulina é armazenada em grânulos, onde permanece até ser liberada. A liberação de insulina ocorre principalmente em resposta a altas concentrações de glicose (Boland *et al.*, 2017). Quando os níveis de glicose no sangue aumentam, as células β captam glicose através do transportador de glicose 2 (GLUT2), uma proteína transportadora que também atua como sensor de glicose nessas células. Com a entrada de glicose, o catabolismo da glicose é ativado, aumentando a razão ATP/ADP intracelular, o que provoca o fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP na membrana plasmática. Isso causa a despolarização da membrana e a abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes de voltagem, permitindo a entrada de Ca^{2+} na célula. O aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} desencadeia o preparo e a fusão dos grânulos secretores de insulina com a membrana plasmática, resultando na exocitose da insulina (Boland *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2013; Rorsman; Ashcroft, 2018; Seino *et al.*, 2011).

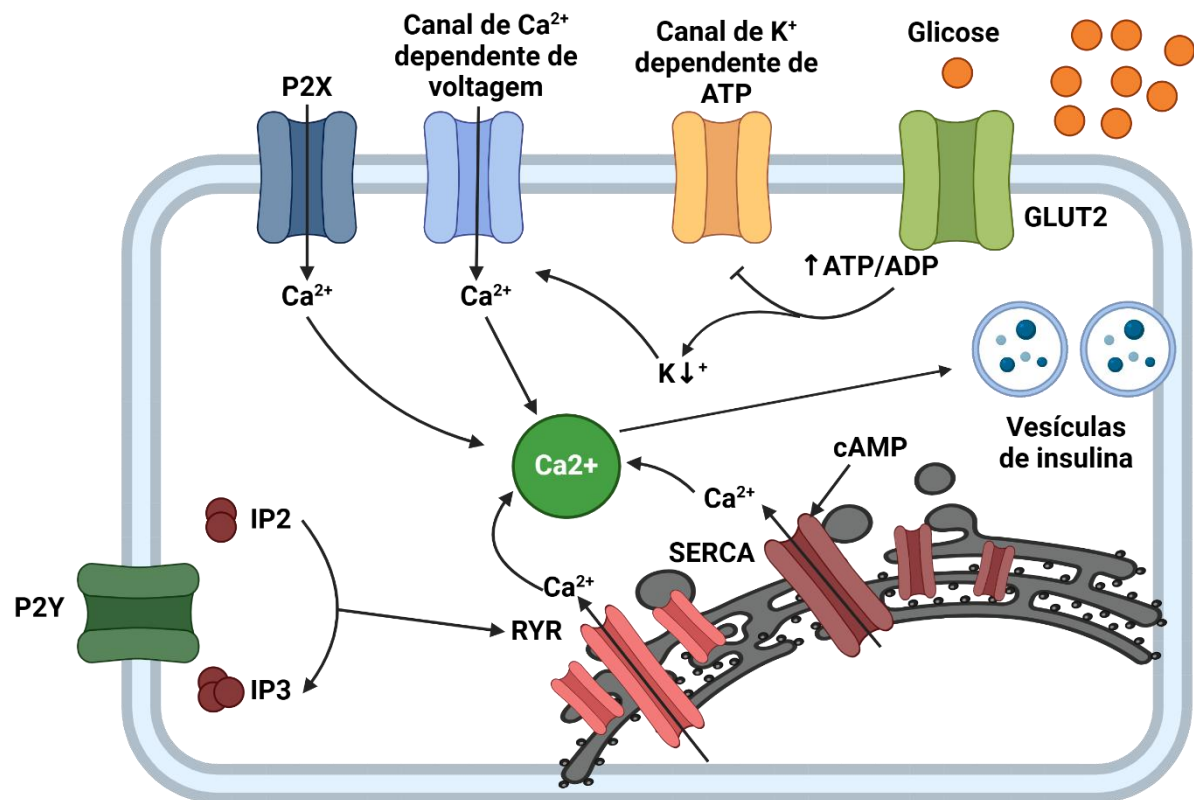


Figura 2. Vias de sinalização envolvidas na secreção de insulina em células β em condições fisiológicas. A liberação de insulina ocorre principalmente em resposta a níveis elevados de glicose, que é absorvida pela célula por meio do transportador GLUT2. O metabolismo da glicose aumenta a relação ATP/ADP, o que provoca o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP, resultando na despolarização da membrana e na ativação dos canais de cálcio controlados por voltagem. O influxo de cálcio que ocorre a seguir desencadeia a exocitose da insulina. Além disso, canais como P2X, P2Y, SERCA e RYR também desempenham um papel na mobilização do cálcio e na secreção de insulina. Fonte: Galicia-Garcia et al., 2020 (Adaptado). Criado com BioRender®.

Como mencionado anteriormente, a secreção de insulina deve ser precisamente regulada para atender adequadamente às demandas metabólicas. Por isso, é essencial manter a integridade das ilhotas pancreáticas, garantindo que as células β possam responder de forma eficaz às necessidades metabólicas. Em condições patológicas, os mecanismos descritos anteriormente podem levar à desorganização das ilhotas, comprometendo a comunicação ideal entre as células dentro dessas estruturas, o que contribui para a desregulação da insulina e do glucagon e, conseqüentemente, para o agravamento da hiperglicemia. Alterações na síntese de precursores de insulina, ou da própria insulina, assim como falhas no processo de secreção, podem resultar em disfunção secretora, sendo este um dos principais fatores responsáveis pela falência das células β e uma base para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 (Hoang Do; Thorn, 2015; Liu *et al.*, 2018).

A dieta ocidental, rica em calorias, contém grandes quantidades de gorduras e carboidratos, elevando os níveis de glicose no sangue e aumentando as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs), quilomícrons (QMs) e seus remanescentes, que são ricos em

triglicerídeos (TG). Esse processo provoca um aumento nas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que leva à geração excessiva de moléculas inflamatórias. Dado que a inflamação é um reconhecido indutor do estresse oxidativo, há uma interação sinérgica entre ambos os processos, amplificando os efeitos pós-prandiais. O aumento sustentado e significativo dos níveis de EROs contribui de maneira importante para a patogênese do diabetes tipo 2 (DM2) e da resistência à insulina (RI). Assim, um ambiente pró-oxidante provoca disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático, ativação da NADPH oxidase e produção de superóxido. O excesso de superóxido ativa cinco principais vias relacionadas às complicações do diabetes: intensificação da via do poliol, aumento da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), maior expressão do receptor de AGEs e seus ligantes ativadores, ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) e hiperatividade da via da hexosamina (Dali-Youcef *et al.*, 2013; Hummasti; Hotamisligil, 2010). Por meio dessas vias, o aumento das EROs intracelulares causa angiogênese defeituosa em resposta à isquemia, ativa múltiplas vias pró-inflamatórias e gera mudanças epigenéticas duradouras, que perpetuam a expressão de genes pró-inflamatórios mesmo após a normalização da glicemia. Além disso, o aumento dos níveis sanguíneos de ácidos graxos livres (AGLs) também resulta em disfunção mitocondrial por dois mecanismos: os subprodutos do metabolismo dos AGLs interferem no fluxo de elétrons ao longo da cadeia respiratória mitocondrial, e a incorporação de AGLs nas membranas mitocondriais pode favorecer o vazamento de elétrons (Graciano *et al.*, 2011).

A resistência à insulina (RI) se refere a uma diminuição na resposta metabólica das células que respondem à insulina ou, de maneira sistêmica, a uma resposta reduzida ou prejudicada à insulina circulante em relação aos níveis de glicose no sangue (Czech, 2017). Existem três principais categorias de RI ou condições associadas à deficiência de insulina: (1) diminuição da secreção de insulina pelas células β ; (2) presença de antagonistas da insulina no plasma, como hormônios contrarreguladores ou substâncias não hormonais que afetam os receptores de insulina ou sua sinalização; e (3) resposta prejudicada à insulina nos tecidos-alvo (Pearson *et al.*, 2016). A ação da insulina é influenciada pela interação com outras moléculas, como o hormônio do crescimento e o IGF-1, no estado alimentado. Durante o jejum, a resposta à insulina é modulada pelo glucagon, glicocorticoides e catecolaminas, para evitar a hipoglicemia induzida pela insulina. A proporção insulina/glucagon é crucial nessa regulação, pois determina o grau relativo de fosforilação das enzimas nas vias de sinalização. Enquanto as catecolaminas estimulam a lipólise e a glicogenólise, os glicocorticoides promovem o catabolismo muscular, a gliconeogênese e a lipólise. Assim, a secreção excessiva desses hormônios pode contribuir para o desenvolvimento da RI (Nussey; Whitehead, 2001; Wilcox,

2005). Três órgãos extrapancreáticos sensíveis à insulina desempenham papéis fundamentais nesses processos: o músculo esquelético, o tecido adiposo e o fígado. A ação deficiente da insulina nesses tecidos geralmente antecede o desenvolvimento da RI sistêmica, levando progressivamente ao diabetes tipo 2 (DM2) (Galicia-Garcia *et al.*, 2020).

A resistência à insulina (RI) no músculo esquelético é considerada o principal fator extrapancreático no desenvolvimento do diabetes tipo 2 (DM2) (Petersen, Kitt F; Shulman, Gerald I, 2002). Em condições fisiológicas, a insulina estimula a síntese de glicogênio muscular ao aumentar a captação de glicose do plasma. Três fatores principais limitam a taxa de captação de glicose e a síntese de glicogênio: glicogênio sintase, hexoquinase e o transportador de glicose 4 (GLUT4) (Petersen, Kitt Falk; Shulman, Gerald I, 2002). Após a insulina se ligar ao receptor de insulina (INSR) nas células musculares, o GLUT4 é translocado dos compartimentos intracelulares para a membrana plasmática, permitindo a captação de glicose e reduzindo os níveis de glicose circulante (Satoh, 2014). Fatores ambientais também influenciam a absorção de glicose pelo músculo. A atividade física, por exemplo, aumenta o fluxo sanguíneo para as células musculares esqueléticas, promovendo uma maior utilização de glicose (Venkatasamy *et al.*, 2013). Por outro lado, a obesidade, associada à inflamação crônica, contribui para a RI e o desenvolvimento do DM2. Evidências crescentes indicam que, como consequência da obesidade, o aumento da infiltração de células imunes e a secreção de moléculas pró-inflamatórias no tecido adiposo entre as fibras musculares e ao redor delas causam inflamação no músculo esquelético. Isso leva a uma inflamação dos miócitos, prejudicando seu metabolismo e contribuindo para a RI por meio de efeitos parácrinos (Wu; Ballantyne, 2017).

O tecido adiposo é metabolicamente dinâmico e capaz de sintetizar diversos compostos biologicamente ativos que regulam a homeostase metabólica em nível sistêmico (Coelho *et al.*, 2013). A insulina influencia o tecido adiposo de duas maneiras: (1) estimulando a captação de glicose e a síntese de triglicerídeos; e (2) suprimindo a hidrólise de triglicerídeos e promovendo a absorção de ácidos graxos livres (AGL) e glicerol da circulação (Gastaldelli *et al.*, 2017). No estado alimentado, o transportador GLUT4 facilita a entrada de glicose nos adipócitos, ativando a glicólise, que resulta na produção de glicerol-3-fosfato, posteriormente utilizado na lipogênese. O glicerol-3-fosfato é esterificado com ácidos graxos provenientes das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs), formando triacilglicerol (TGA), que é armazenado em gotículas lipídicas. Durante o estresse metabólico, essas gotículas de TGA nos adipócitos são mobilizadas para fornecer AGL como fonte de energia para outros tecidos (Galicia-Garcia *et al.*, 2020).

Uma resposta ineficaz à estimulação da insulina no tecido adiposo pode resultar em lipólise inadequadamente suprimida, captação insuficiente de glicose e liberação aumentada de ácidos graxos livres (AGLs) no plasma, mesmo com níveis elevados de insulina (Czech, 2020). Dentre os componentes de sinalização afetados pela resistência à insulina (RI) no tecido adiposo, a ativação defeituosa de AKT compromete a translocação do transportador GLUT4 para a membrana celular e estimula a ativação de enzimas lipolíticas, agravando a hiperglicemia (Czech, 2017). A RI no tecido adiposo está associada à intolerância à glicose e ao aumento da liberação de AGLs no plasma, que se acumulam em outros tecidos, como o músculo esquelético e o fígado. No fígado, o acúmulo de AGLs prejudica a sinalização da insulina, favorecendo a gliconeogênese hepática e comprometendo a resposta do fígado à insulina induzida pela glicose, contribuindo para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 (DM2) (Galicia-Garcia *et al.*, 2020).

No fígado, a insulina desempenha um papel crucial tanto na regulação da produção e utilização de glicose quanto no metabolismo lipídico em geral. Quando os níveis de glicose no sangue aumentam, as células β pancreáticas secretam insulina, que se liga aos seus receptores hepáticos, desencadeando sua autofosforilação. Esse processo leva ao recrutamento e fosforilação dos substratos do receptor de insulina, que ativam a PI3K. A PI3K, por sua vez, fosforila o fosfatidilinositol-4-5-bifosfato (PIP2), convertendo-o em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). O PIP3 ativa a PDK1, que então fosforila o AKT, que também é fosforilado pela mTORC2. Com o AKT completamente ativado, ele participa de múltiplas vias metabólicas a jusante, regulando processos como síntese de glicogênio, gliconeogênese, glicólise e síntese de lipídios (Titchenell *et al.*, 2017).

Em condições fisiológicas, a ação combinada do glucagon e da insulina assegura a regulação precisa da produção de glicose pelo fígado. Enquanto o glucagon estimula a produção hepática de glicose, a insulina age como um potente inibidor desse processo quando seus níveis no sangue estão elevados (Cherrington *et al.*, 2007). No entanto, em casos de resistência à insulina (RI) no fígado, a síntese de glicogênio é prejudicada, a produção de glicose não é suprimida adequadamente, há um aumento na lipogênese e na síntese de proteínas pró-inflamatórias. Essa produção anormal de proteínas pró-inflamatórias, associada a fatores como o estresse oxidativo, pode levar a um estado inflamatório que contribui para a resposta alterada do fígado à insulina (Leclercq *et al.*, 2007).

2.1.3 Complicações e Impacto na Saúde do DM2

Em condições de excesso nutricional, como as observadas na obesidade, a hiperglicemia e a hiperlipidemia são comuns, promovendo a resistência à insulina (RI) e a inflamação crônica. Nessa situação, as células β enfrentam pressões tóxicas, incluindo inflamação, estresse inflamatório, estresse do retículo endoplasmático (RE) e estresse oxidativo, o que pode resultar na perda da integridade das ilhotas pancreáticas (Christensen; Gannon, 2019).

O excesso de ácidos graxos livres e a hiperglicemia causam disfunção nas células β , induzindo estresse no retículo endoplasmático (RE) por meio da ativação das vias da resposta à proteína mal dobrada (RPD) (Yamamoto *et al.*, 2019). A lipotoxicidade, glicotoxicidade e glicolipotoxicidade associadas à obesidade geram estresse metabólico e oxidativo, resultando em danos às células β (Halban *et al.*, 1971). O estresse causado por altos níveis de ácidos graxos saturados ativa a RPD por diferentes mecanismos, como a inibição da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático/endoplasmático (SERCA), responsável pela mobilização de Ca^{2+} no RE; ativação de receptores IP3; ou comprometimento direto da homeostase do RE. Além disso, níveis elevados e constantes de glicose aumentam a biossíntese de pró-insulina e polipeptídeos amiloides nas células β , causando acúmulo de insulina mal dobrada e de polipeptídeos, além de elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido ao dobramento oxidativo de proteínas (Yamamoto *et al.*, 2019). Esses processos alteram a mobilização fisiológica de Ca^{2+} no RE, favorecem sinais pró-apoptóticos, promovem a degradação do mRNA de pró-insulina e induzem a liberação de interleucina-1 (IL-1), que recruta macrófagos e intensifica a inflamação local nas ilhotas (Halban *et al.*, 1971).

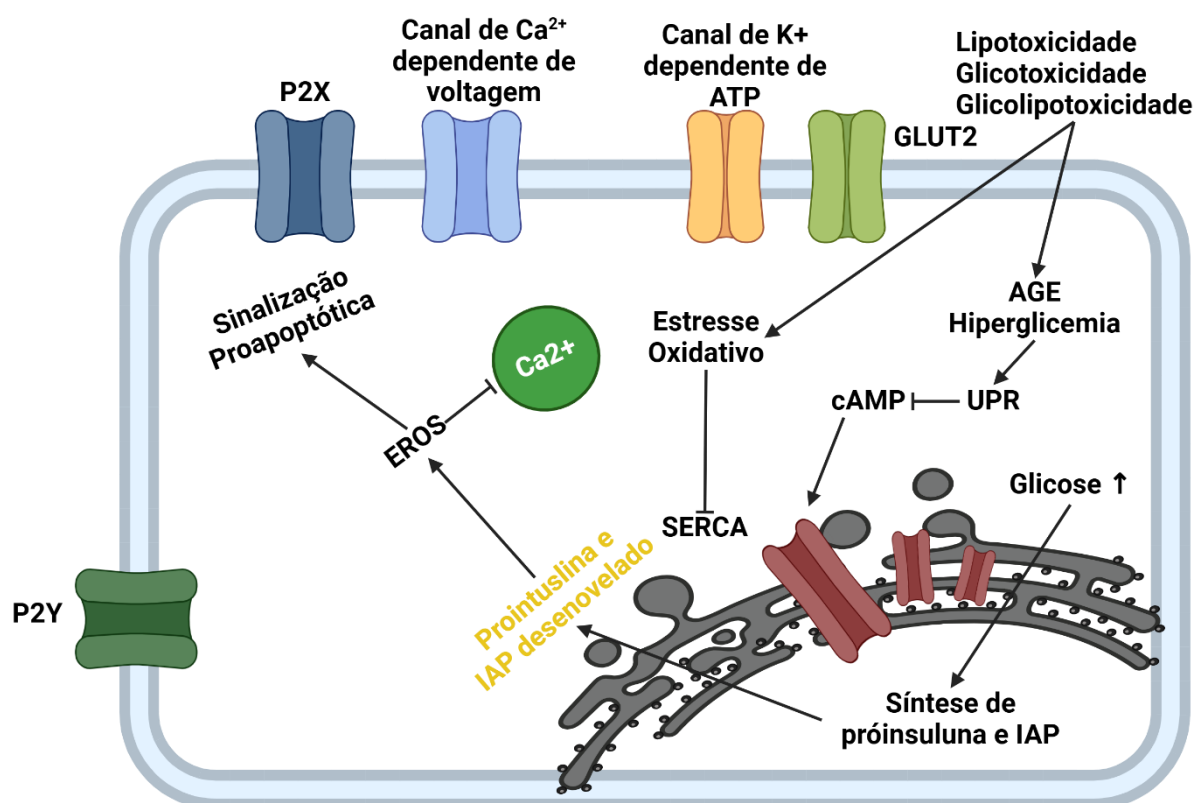


Figura 3. Mecanismos que levam a disfunção de células beta. A hiperglicemia e a hiperlipidemia causam estresse oxidativo, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que bloqueiam a mobilização de cálcio e desencadeiam sinais pró-apoptóticos. O excesso de ácidos graxos livres e os altos níveis de glicose ativam as vias apoptóticas da resposta a proteína mal não dobrada (RPD), gerando estresse no retículo endoplasmático. A glicose elevada por longos períodos também aumenta a produção de pró insulina, contribuindo para a formação de EROS. . Fonte:Galicia-Garcia et al., 2020 (Adaptado). Criado com BioRender®.

Como mencionado anteriormente, o DM2 é uma doença que afeta múltiplos sistemas (Gast *et al.*, 2012). Na maioria dos casos, o DM2 está associado a uma série de complicações em tecidos periféricos, como os rins, sistema cardiovascular, retina, sistema nervoso e fígado. Embora os sintomas e as manifestações dessas complicações sejam bem descritos, os mecanismos moleculares envolvidos ainda não estão completamente esclarecidos (Demir *et al.*, 2021).

A doença renal diabética (DRD), também conhecida como nefropatia diabética, é uma complicação microvascular do DM1 ou DM2, com uma taxa de prevalência entre 30% e 40%. A DRD é responsável por 30% a 47% dos casos de doença renal terminal (DRT) e é uma das principais causas de morte associada ao diabetes. Um controle mais rigoroso dos níveis de glicose no sangue está relacionado a uma redução na progressão da DRD. No entanto, pacientes com diabetes ainda podem desenvolver a doença renal, mesmo com controle estrito da glicemia (Coca *et al.*, 2012; Falkevall *et al.*, 2017). A hiperglicemia e a resistência à insulina aumentam a expressão de angiotensina II, que, por sua vez, induz a produção de espécies reativas de

oxigênio (EROs) e ativa a sinalização do TGF β 1 (Chang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2009). Embora haja evidências de que o TGF β 1 desempenhe um papel fundamental na fisiopatologia da DRD, as terapias direcionadas a esse alvo não demonstraram eficácia em estudos clínicos (Chang *et al.*, 2017).

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de mortalidade e morbidade entre pacientes com diabetes. Mais de 30% dos indivíduos com DM2 apresentam complicações cardiovasculares, e quase metade das mortes associadas ao DM2 resulta de DCV (Einarson *et al.*, 2018). A DCV inclui uma variedade de disfunções no sistema cardiovascular, como aterosclerose, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e cardiomiopatia. Embora o número de estudos que investigam a relação entre DM2 e DCV esteja crescendo rapidamente, os mecanismos patogênicos exatos ainda não estão completamente definidos (Demir *et al.*, 2021).

A retinopatia diabética é uma complicação comum do diabetes, presente em cerca de 20% dos pacientes já no momento do diagnóstico e desenvolvida por 40-45% dos indivíduos ao longo da doença. Essa condição envolve a disfunção de dois tipos principais de células na retina: as células endoteliais da microvasculatura retiniana e os pericitos, que se localizam abaixo das células endoteliais para apoiar e regular sua função. Em resumo, a hiperglicemia, o estresse oxidativo e os AGEs comprometem as junções apertadas entre as células endoteliais e promovem o deslocamento e a apoptose dos pericitos (Demir *et al.*, 2021).

Quase metade dos pacientes com diabetes apresenta complicações no sistema nervoso autônomo e periférico, conhecidas como neuropatia diabética. Geralmente, essa condição afeta as terminações nervosas sensoriais periféricas das mãos e membros inferiores, resultando em dor, sensação de queimação, formigamento e dormência. Com a progressão da doença, as terminações nervosas motoras nas extremidades inferiores também são danificadas, levando à perda de equilíbrio e à dormência dos pés, acompanhada pela redução da sensibilidade (Pham *et al.*, 2011; Pham *et al.*, 2015; Schwarz, D. *et al.*, 2020).

Além das patologias mencionadas anteriormente, dados recentes indicam que doenças pulmonares restritivas, como a fibrose pulmonar, também podem surgir como complicações tardias do diabetes (Kopf *et al.*, 2018; Kopf; Nawroth, 2018). Embora esse seja um conceito relativamente novo e ainda haja poucos estudos sobre os mecanismos envolvidos, evidências substanciais sugerem que o dano ao DNA causado pela hiperglicemia e pelo estresse oxidativo pode contribuir para o desenvolvimento da fibrose pulmonar associada ao diabetes (Kumar *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2017).

Entre 13% e 14% dos pacientes com diabetes enfrentam disfunções cognitivas variadas, incluindo demência, problemas de atenção, memória verbal prejudicada e déficits no

funcionamento executivo. A resistência à insulina no cérebro pode ser um dos mecanismos subjacentes que contribuem para o comprometimento da função neural. Outras causas potenciais incluem neuroinflamação, desregulação do metabolismo do ferro e acúmulo de proteína tau hiperfosforilada, que forma agregados proteicos, estabelecendo uma forte associação entre DM2 e a doença de Alzheimer (Lee *et al.*, 2018).

As complicações do DM2 contribuem significativamente para a morbidade e mortalidade associadas à doença. Diante desses desafios, a busca por novas abordagens terapêuticas tem se intensificado, incluindo a investigação de mecanismos celulares, como o estresse do retículo endoplasmático que pode desempenhar um papel crucial na progressão do DM2.

2.1.4 Doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) no DM2

A DHGNA é considerada uma das doenças hepáticas mais frequentes da atualidade, caracterizando-se pelo acúmulo de gordura no fígado, quando este excede 5-19% do seu peso, elevações das enzimas hepáticas e alterações na função hepática, podendo variar de esteatose a esteato-hepatite, fibrose e cirrose (Scheidt *et al.*, 2018). Estima-se que a DHGNA afeta um bilhão de indivíduos em todo o mundo e pode estar presente em aproximadamente 25% da população mundial. A prevalência de DHGNA parece aumentar com a idade e no sexo masculino. O diagnóstico de DHGNA requer evidência de esteatose hepática, seja por imagem ou histologia, e ausência de etiologias secundárias de acúmulo de gordura hepática, como consumo excessivo de álcool, uso prolongado de medicamentos esteatogênicos (como tamoxifeno), infecção pelo vírus da hepatite C, distúrbios hereditários monogênicos, desnutrição grave e doença de Wilson (Cotter; Rinella, 2020)

A DHGNA é manifestação hepática da síndrome metabólica e vem se tornando uma complicação cada vez mais comuns DM2. Em condições normais, o fígado tem uma excelente capacidade de lidar com o estresse agudo e se regenerar quando necessário. A apoptose de células danificadas é fundamental nesse processo regenerativo, mas deve ser controlada para manter a função hepática saudável. No entanto, a exposição contínua à hiperglicemia, resistência à insulina e ao acúmulo excessivo de lipídios induz um estado inflamatório crônico, onde a lipotoxicidade e o estresse oxidativo favorecem a progressão da DHGNA para fibrose e, eventualmente, para cirrose se não tratada adequadamente. Não existem terapias específicas para tratar essa patologia e/ou fibrose hepática e, atualmente, já representam a principal causa de transplantes de fígado em todo o mundo (Demir *et al.*, 2021).

A insulina, como hormônio anabólico, desempenha um papel central no armazenamento de triglicerídeos. Ela facilita a esterificação e armazenamento de ácidos graxos e inibe a lipólise. Sob condições normais, as células β do pâncreas liberam insulina após uma refeição ou em resposta a liberação de hormônios, como catecolaminas e glucagon. A insulina reduz a produção de glicose hepática e estimula a absorção de glicose pelos tecidos periféricos, enquanto hormônios como o GLP-1 promovem gliconeogênese, glicogenólise e produção hepática de glicose. Além de favorecer a captação de glicose pelo tecido adiposo e hepática, a insulina também inibe a produção de glicose pelo fígado (Kumar, 2020). Em pessoas com DM2, a depuração hepática de insulina é diminuída, correlacionando-se com a gravidade da síndrome metabólica. Curiosamente, a insulina tem propriedades anti-inflamatórias e pró-inflamatórias (Bergman *et al.*, 2019).

O termo “resistência insulínica” refere-se, em geral, à captação reduzida de glicose mediada pela insulina, sendo caracterizada pela resposta celular inadequada a níveis normais de insulina em diferentes tecidos. Essa resistência aumenta a glicólise e a liberação de ácidos graxos livres para suprir necessidades periféricas, direcionando a maior parte da glicose para o cérebro (Akuta *et al.*, 2020). Como resultado, a hiperinsulinemia ocorre devido ao esforço das células β para compensar a resistência, aumentando a liberação de insulina. A ingestão calórica excessiva prejudica a sinalização do receptor de insulina, resultando em uma supressão inadequada da liberação de ácidos graxos livres e comprometimento na liberação de óxido nítrico (NO) (Gambino *et al.*, 2016). A resistência insulínica e a inflamação criam um ciclo vicioso, no qual cada condição intensifica a outra, acelerando o desenvolvimento da DHGNA e outros distúrbios metabólicos na presença de lipotoxicidade (Hong; Choi, 2020). Em obesos e magros, a resistência à insulina elevada foi o fator mais relevante para DHGNA, e estudos associam os níveis séricos de insulina ao balonamento e à inflamação lobular hepática (Enooku *et al.*, 2018; Huang, J.-F. *et al.*, 2020). A complexa relação entre resistência à insulina, DHGNA e DM2 é mantida por um ciclo vicioso, em que a obesidade induzida por dietas desencadeia as vias de lipotoxicidade e glicotoxicidade, ambas mediadas pela insulina através da resistência à insulina (Tanase *et al.*, 2020).

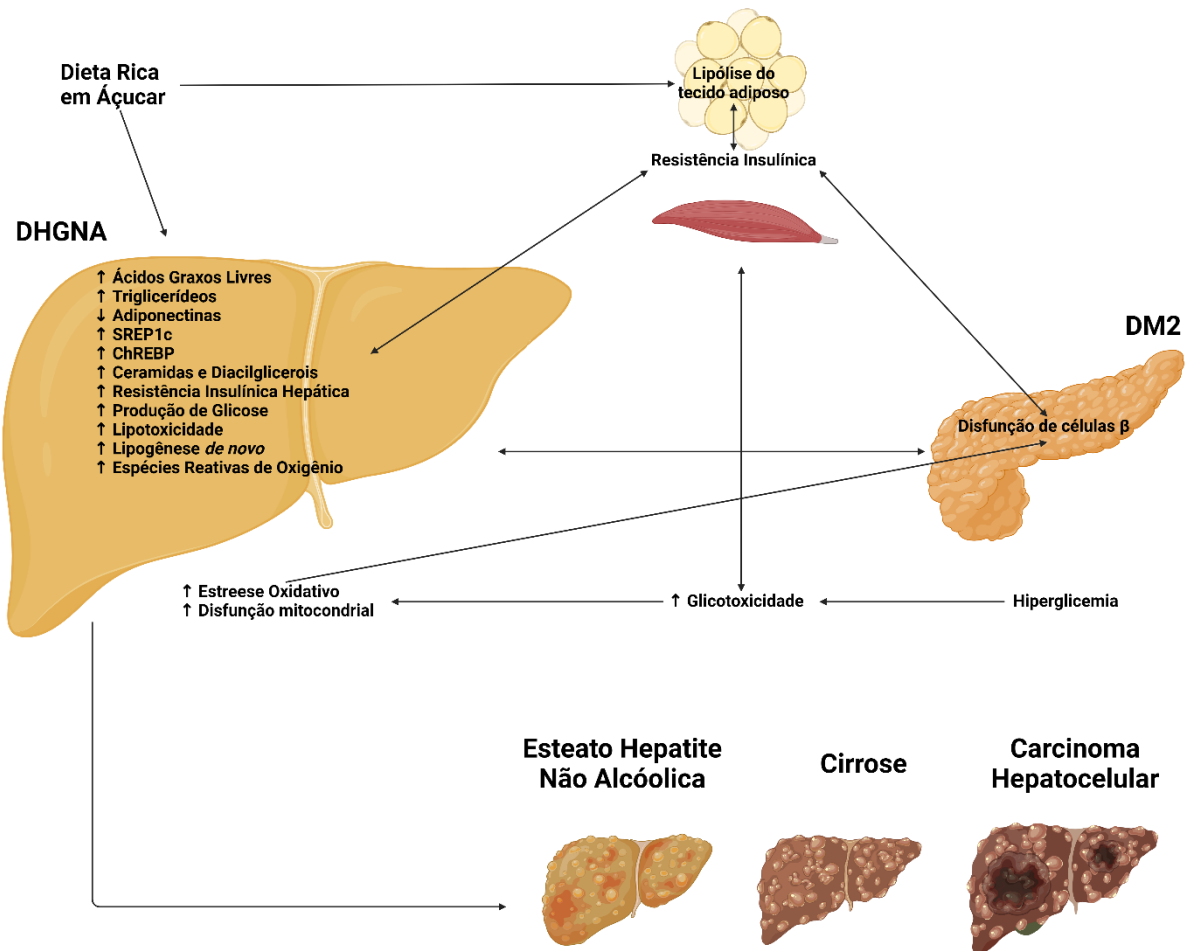


Figura 4. Mecanismos que ligam DHGNA e DM2. Interação entre fígado, tecido adiposo e pâncreas na fisiopatologia da resistência insulínica e da disfunção hepática induzida pelo consumo excessivo de açúcar. Dietas ricas em açúcares (DRS) simples estimulam, inicialmente, a lipólise do tecido adiposo, levando ao aumento de ácidos graxos livres na circulação, que são captados pelo fígado, contribuindo para o aumento da síntese de triglicerídeos, ativação de proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico, como SREBP1c e ChREBP, e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As DRS também estimulam lipogênese *de novo* no fígado através do ChREBP e SREBP1c. Todas essas alterações promovem lipotoxicidade, resistência insulínica hepática e gliconeogênese, exacerbando a produção de glicose e o acúmulo de ceramidas e diacilgliceróis no fígado. Esse processo contribui para a progressão de doenças hepáticas, como esteatose, esteato-hepatite e cirrose hepática. No pâncreas, ocorre disfunção das células β, agravando o quadro de resistência insulínica e favorecendo o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2. Fonte: Tanase et al., 2020 (Adaptado).

2.2 Estresse do Retículo Endoplasmático (RE)

2.2.1 Definição e Funções do Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela celular multifuncional com papel vital em múltiplos processos fisiológicos. O RE orchestra o dobramento e a translocação de proteínas secretoras e transmembranares, regula o Ca^{2+} celular, armazenamento e sinalização, e participa da produção de lipídeos celulares, como colesterol, glicerofosfolípidios e ceramidas. Uma grande proporção da síntese de proteínas intracelulares ocorre dentro do lúmen do RE. A

interrupção da capacidade de dobramento da proteína leva ao acúmulo de proteínas desdobradas no lúmen do RE. A perturbação resultante da homeostase do RE é chamada de estresse do RE (ERE). Mecanismos adaptativos, incluindo a degradação associada a RE (ERAD), resposta à proteína desdobrada (RPD) e reticulofagia, são ativados para neutralizar o estresse elevado do RE. O ERAD controla a remoção de proteínas mal dobradas do lúmen do RE. A RPD tenta restaurar a proteostase, mas a ativação persistente da RPD pode levar a uma resposta pro-apoptótica. A reticulofagia é um processo de remodelação do RE e reciclagem seletiva do RE por autofagia, que reduz o estresse do RE removendo o excesso de membranas e proteínas do RE. Além disso, o RE se comunica com organelas vizinhas, incluindo endossomos, lisossomos, fagossomos, mitocôndrias e membrana plasmática, todos essenciais para facilitar o metabolismo lipídico, homeostase do cálcio e a troca de vários íons entre as organelas (Ren *et al.*, 2021).

2.2.2 Mecanismos de Estresse do Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela exclusiva de células eucariotas, que se forma a partir de invaginações da membrana nuclear, gerando cisternas em formato de lâmina e uma rede de túbulos que se conecta o espaço perinuclear a outras organelas citoplasmáticas. Ele se divide morfológicamente em duas partes distintas, o retículo endoplasmático rugoso e o liso, diferenciadas pela presença ou ausência de ribossomos ligados à sua superfície citoplasmática. O RE liso está principalmente envolvido na síntese de lipídeos e esteroides, biogênese da membrana e armazenamento de cálcio, enquanto o RE rugoso é o local principal de dobramento de proteína (Bravo *et al.*, 2013; Shibata *et al.*, 2006). O controle da qualidade no dobramento de proteínas é mantido por chaperonas transmembranares e lumenais, que auxiliam no dobramento das proteínas recém-sintetizadas, na sua correta movimentação e secreção, enquanto direcionam as proteínas mal dobradas para o tráfego retrógrado ao citosol e posterior degradação proteossoma (Araki; Nagata, 2011).

O núcleo de chaperonagem (dobramento proteico) é composto principalmente por calnexina (CNX) e calreticulina (CRT), que possuem um domínio em forma de braço estendido para interação com a ERP57, uma tiol oxidoredutase da família da proteína dissulfeto isomerase (PDI). As proteínas recém-sintetizadas são capturadas pelo complexo CNX/CRT/ERP57, permitindo que as enzimas foldase e isomerase atuem na formação da estrutura terciária. Além disso, a proteína regulada pela glicose de 78 kDa (GRP78 ou BiP) tem um papel essencial na modulação do influxo de proteínas, no selamento de canais de

translocação inativos, no dobramento proteico, oligomerização e desagregação. Se o processo de chaperonagem falhar, as proteínas não dobradas ou mal dobradas são degradadas por um mecanismo conhecido como degradação associada ao RE (ERAD), que inclui ubiquitinação, translocação do RE para o citosol e degradação proteossoma. Esses processo contribuem para a manutenção da homeostase proteica do RE, frequentemente referida como proteostase do RE (Araki; Nagata, 2011; Hebert; Molinari, 2007).

Apesar do rigoroso controle de qualidade no retículo endoplasmático, sua homeostase pode ser desafiada por diversas condições, como hipóxia, isquemia, privação de sono, jejum prolongado, excesso de absorção celular de carboidratos e lipídios, alterações anormais nos níveis intracelulares de cálcio, além do estresse oxidativo. Esses fatores prejudicam o dobramento, tráfego e secreção de proteínas, resultando no acúmulo de proteínas mal dobradas ou não dobradas no lúmen do RE, uma condição conhecida como estresse do RE. Para restaurar a homeostase, as células ativam vias adaptativas de sinalização mediadas pela resposta à proteína desdobrada (RPD), que têm como objetivos: (1) reduzir a síntese global de proteínas para evitar a sobrecarga do RE e melhorar a qualidade do dobramento; (2) aumentar a produção de chaperonas e proteínas antioxidantes; (3) intensificar a síntese de componentes da via de degradação associada ao RE (ERAD); (4) degradar mRNAs defeituosos; e (5) ativar mecanismos de autofagia (Wang; Kaufman, 2016).

As vias adaptativas da RPD são ativadas por três proteínas transmembranares do retículo endoplasmático: *inositol-requiring enzyme-1* (IRE-1), *protein kinase RNA-like ER kinase* (PERK) e *activating transcription factor 6* (ATF6). Um aspecto comum dessas proteínas sensoriais é que possuem um domínio luminal, responsável pela detecção de proteínas desdobradas, e um domínio citosólico, que transmite sinais para a regulação transcricional e traducional (Rutkowski; Kaufman, 2004). Em condições normais, a GRP78 se liga a essas proteínas sensoras, ocultando seus domínios de detecção luminal. No entanto, quando a homeostase do RE é perturbada, a GRP78 se dissocia para ajudar no dobramento de proteínas, permitindo que as proteínas sensoras se autofosforilem, dimerizem ou oligomerizem, ativando suas respectivas vias de sinalização (Cao *et al.*, 2012; Pfaffenbach; Lee, 2011).

IRE-1 é uma proteína transmembrana do retículo endoplasmático do tipo I, presente em duas isoformas. A IRE-1 α é expressa de maneira ubíqua, desde leveduras até humanos, sendo crucial para o desenvolvimento embrionário, enquanto a IRE-1 β é especificamente expressa em células epiteliais do intestino de mamíferos (Hollien, 2013; Urano *et al.*, 2000). Ambas as isoformas possuem atividades de quinase Ser/Thr e endoribonuclease únicas, sendo responsáveis por catalisar um *splicing* não convencional de um íntron de 26 nucleotídeos do

mRNA Xbp1 não processador (Xbp1u), gerando sua forma processada (Xbp1s). A tradução de Xbp1s resulta em um potente fator de transcrição que atua como regulador principal da capacidade funcional do retículo endoplasmático (Gardner; Walter, 2011; He *et al.*, 2010). No núcleo, o XBP1s aumenta a expressão de genes que codificam chaperonas, componentes da via ERAD e do maquinário de síntese de fosfolípidos, essenciais para a expansão da membrana do retículo endoplasmático durante o estresse do RE (Lee *et al.*, 2003). Embora a função da proteína XBP1u, traduzida a partir do mRNA Xbp1u, seja pouco compreendida, sabe-se que ela pode formar heterodímeros com XBP1s, suprimindo sua função em determinadas condições (Yoshida *et al.*, 2006).

PERK é uma proteína transmembrana do tipo 1 no retículo endoplasmático, estrutural e funcionalmente semelhante à IRE-1 α . Sua ativação resulta na fosforilação do resíduo Ser51 na subunidade α do fator de iniciação eucariótico 2 (eIF2 α), o que leva à tradução do *activating factor 4* (ATF4) (Harding *et al.*, 2000). A fosforilação de eIF2 α por PERK inibe a formação do ribossomo 80S, causando uma redução geral na síntese de proteínas. Enquanto isso, ATF4 promove a expressão de genes relacionados à sobrevivência celular, incluindo aqueles envolvidos no dobramento de proteínas (principalmente chaperonas), equilíbrio redox, metabolismo de aminoácidos e autofagia (Ameri; Harris, 2008). Além disso, PERK também fosforila e ativa o *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2), levando à sua dissociação da proteína KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), e à migração de NRF2 para o núcleo, onde ele se liga a *antioxidant responsive element* (ARE) nos promotores de genes para regular a transcrição de genes antioxidantes e desintoxicantes de fase II (Nguyen *et al.*, 2009).

Em contraste com IRE-1 α e PERK, ATF6 (nas isoformas α e β) é uma proteína transmembrana do tipo II com 90 kDa que codifica um fator de transcrição *basic leucine zipper* (bZIP) em seu domínio citosólico. Durante o estresse do RE, o ATF6 interage com a proteína *coat protein II* (COPII) e é transportado do RE para o Complexo de Golgi, onde é clivado sequencialmente pelas proteases *site-1* e *site-2* (S1P e S2P, respectivamente). Essa clivagem libera o fator de transcrição ATF6 ativo de 50kDa (ATF6f). O ATF6f é então translocado para o núcleo, onde regula positivamente a expressão de genes que codificam componentes da via ERAD e Xbp1 (Shen; Prywes, 2005).

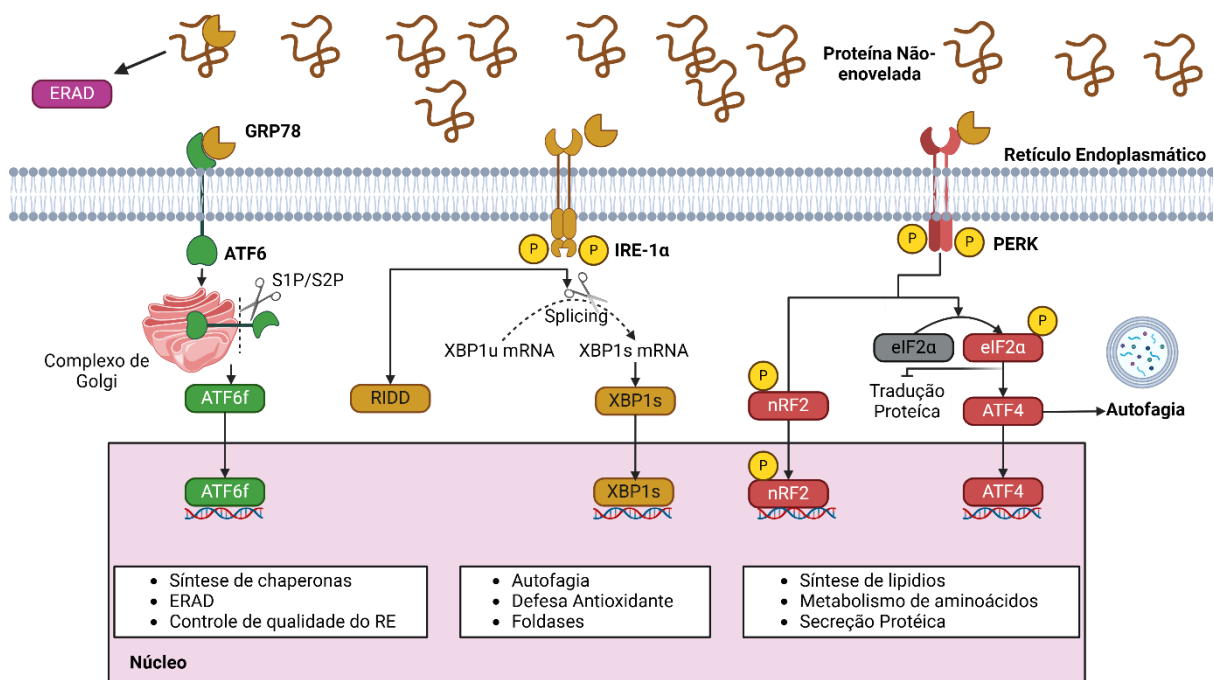


Figura 5. As vias de sinalização da RPD. As vias de sinalização da RPD começam quando há uma falha no dobramento de proteínas no lúmen do retículo endoplasmático (RE), o que resulta no acúmulo de proteínas não dobradas, gerando o estresse no RE. Para tentar restaurar o equilíbrio, uma série de processos adaptativos é ativada. O primeiro mecanismo de defesa envolve o chaperonamento correto dessas proteínas defeituosas por várias chaperonas, com destaque para a GRP78 (ou BiP). Se as proteínas não forem corrigidas, são direcionadas para a o centro de degradação associada ao RE (ERAD), um processo no qual as proteínas não dobradas são retrafegadas para o citosol, poliubiquitinadas e degradadas pelos proteassomos. Ao mesmo tempo, a resposta às proteínas é acionada com a ativação de três sensores transmembranais: IRE1, PERK e ATF6. A ativação de cada um desses sensores acontece quando a GRP78 se dissocia deles para ajudar no dobramento proteico. ATF6, uma vez liberado, é transportado ao Aparelho de Golgi, onde é clivado, liberando um fragmento que entra no núcleo e a expressão de genes específicos. IRE1 se dimeriza e autofosforila, ativando sua função de RNase, que edita o mRNA XBP1, transformando-o em XBP1s, um fator de transcrição que também se dirige ao núcleo. Além disso, IRE1 degrada mRNAs defeituosos por meio do processo RIDD. Já a PERK, após ativação, fosforila o eIF2α, reduzindo a tradução proteica global e ativando o fator de transcrição ATF4. PERK também pode fosforilar o nRF2, um regulador da resposta antioxidante. Juntos, ATF6f, XBP1s, nRF2 e ATF4 promovem a expressão de genes que aumentam a produção de chaperonas, componentes do ERAD, melhoram o controle de qualidade do RE, estimulam a autofagia, a defesa antioxidante e outros processos que garantem a homeostase celular. Fonte: Pinto et al., 2018 (Adaptado)

Como discutido anteriormente, a RPD é ativada para restaurar a homeostase do retículo endoplasmático (ER) em situações de estresse agudo. No entanto, quando a ativação da RPD se prolonga, ela pode desencadear a apoptose, principalmente através da ativação das proteínas ATF4 e ATF6, que regulam a proteína *C/EBP homologous protein* (CHOP). CHOP, um membro da família C/EBP de fatores de transcrição bZIP, é amplamente reconhecido como um marcador chave da via apoptótica mediada pelo estresse do RE. As ações subsequentes associadas a CHOP incluem: (1) supressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) (McCullough et al., 2001); (2) ativação de fatores pró-apoptóticos, como BIM (*Bcl-2-like protein 11*) (Puthalakath et al., 2007), PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) (Puthalakath et al., 2007), BAX (*Bcl-2 associated X protein*) e BAK (*Bcl-2*

homologous antagonist killer) (Zong *et al.*, 2003); (3) aumento da expressão de TRB3 (*tribbles homolog 3*), um modulador de sinalização em cascatas apoptóticas (Ohoka *et al.*, 2005); e (4) ativação de GADD34, que promove a desfosforilação de eIF2 α (Marciniak *et al.*, 2004). Além disso, a CHOP contribui para o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas mitocôndrias, levando à oxidação de tióis essenciais nos canais de Ca²⁺ sensíveis à rianodina e prejudicando a homeostase de Ca²⁺ (Rozpedek *et al.*, 2015). A CHOP também reduz a expressão de GRP78, intensificando o estresse do RE (Zhao *et al.*, 2015).

Além da CHOP, outras vias também desempenham um papel importante na apoptose induzida pelo estresse do retículo endoplasmático (RE). Por exemplo, a ativação da *c-jun n-terminal quinase* (JNK) medida por IRE-1 α resulta na supressão da BCL-2 e na regulação da expressão de BIM (Lei; Davis, 2003; Yang; Yao, 2015). De forma semelhante, a proteína tumoral p54 aumenta a expressão de PUMA e NOXA, que são componentes cruciais da família de proteínas apoptóticas BH3-only (Shibue *et al.*, 2006). A hipertativação de IRE-1 α também promove a expressão da proteína pró-oxidante TXNIP (proteína que interage com tiorredoxina), a qual ativa inflamassomas, além de desencadear a morte celular por uma via dependente de Caspase-1 (Chen, D. *et al.*, 2018; Lerner *et al.*, 2012).

A amplificação de todos esses fatores pró-apoptóticos associados ao RE converge para o comprometimento da integridade mitocondrial, resultando na morte celular. A superexpressão de proteínas BH3-only, como BIM, PUMA e NOXA, inibe as proteínas da família BCL-2, que tem função protetora na mitocôndria, e ativa diretamente os fatores pró-apoptóticos BAX e BAK. A ação de BAX e BAK leva ao comprometimento da membrana mitocondrial externa, permitindo a liberação de citocromo C no citoplasma. Essa liberação desencadeia a ativação das caspases efetoras, como a Caspase-3, que conduzem a célula de forma irreversível à apoptose ou necrose (Iurlaro; Muñoz-Pinedo, 2016; Tait; Green, 2013).

Os mecanismos que controlam a mudança da sinalização adaptativa da RPD para uma resposta apoptótica ainda não são completamente compreendidos. Pesquisas realizadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* indicam que fatores de adaptação e componentes do ERAD são produzidos simultaneamente com elementos da RPD que promovem a morte células (Hetz, 2012; Pinto *et al.*, 2016). As proteínas IRE-1 α e PERK parecem ter um papel crucial nesse processo de transição. Durante a fase adaptativa, ambos os caminhos, IRE-1 α e PERK, são ativados. Contudo, quando o estresse do RE persiste, a expressão de IRE-1 α é reduzida por moduladores negativos, enquanto PERK e seus fatores pró-apoptóticos relacionados, como CHOP e GADD34, continuam ser expressos (Lin *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2016; Woehlbier; Hetz, 2011).

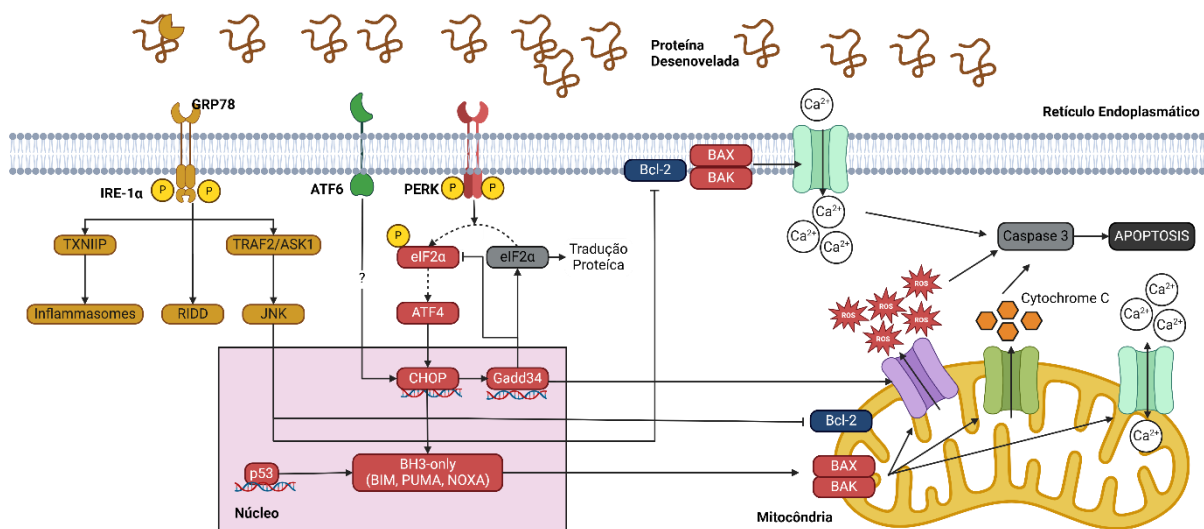


Figura 6. Vias apoptóticas associadas ao estresse do RE. As vias de apoptose relacionadas ao estresse do retículo endoplasmático (RE) ocorrem quando o estresse crônico do RE faz a sinalização adaptativa da RPD mudar para um estado pró-apoptótico. Nesse processo, a IRE-1 α também degrada mRNAs de proteínas responsáveis pelo dobramento correto através do mecanismo RIDD, além de induzir a expressão de TXNIP, uma proteína pró-oxidante que ativa os inflamassomas. A sinalização via ATF4 e ATF6 estimula a superexpressão do fator de transcrição CHOP, que suprime Bcl-2 e aumenta a produção de fatores pró-apoptótico da família BH3, como BIM, PUMA e NOXA, além de BAX e BAK. CHOP também eleva os níveis de GADD35, o que desfosforila o eIF2 α e estimula a produção de espécies reativas de oxigênio mitocôndrias. Além disso, a proteína tumoral p53 auxilia na ativação desses fatores apoptóticos. Nas mitocôndrias, essa cascata de sinais apoptóticos cria um ambiente oxidativo mediado por EROS, provoca a liberação de citocromo C e interrompe a homeostase do cálcio, levando à ativação da via de apoptose regulada por caspases e à morte celular programada. Fonte: Pinto et al., 2018 (Adaptado).

Além dos conhecidos papéis do estresse de RPD e do RE na sobrevivência celular, há evidências que destacam sua importância na regulação da fisiologia e do metabolismo celular, assim como na iniciação e progressão de diversas doenças humanas (Rutkowski; Hegde, 2010). Os componentes da RPD influenciam diferentes processos fisiológicos, como a diferenciação celular (Han *et al.*, 2013; Iwakoshi *et al.*, 2003), a atividade secretora (Harding *et al.*, 2001; Huh *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2005), a imunidade inata (Martinon *et al.*, 2010), a cognição e neurogênese (Costa-Mattioli *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2007), e o metabolismo de glicose (Wagner; Moore, 2011) e lipídios (Wang *et al.*, 2012). Adicionalmente, diversos estudos indicam que o fracasso na sinalização adaptativa da RPD e a ativação das vias de estresse ER pró-apoptóticas estão intimamente ligados a doenças do desenvolvimento, como distúrbios genéticos (Imai *et al.*, 2002; Nichols *et al.*, 1998), câncer (Urrea *et al.*, 2016), doenças neurodegenerativas (Hetz; Mollereau, 2014), e disfunções metabólicas (Hasnain *et al.*, 2014; Ozcan *et al.*, 2004; Rutkowski *et al.*, 2008).

2.2.3 Estresse do RE no Contexto do DM2

O estresse do RE é desencadeado por diversas condições que perturbam a sua função, resultando na ativação da RPD, um mecanismo celular de adaptação e sobrevivência. No contexto das doenças crônicas, como o DM2, essa resposta pode se tornar desregulada, contribuindo para a patogênese da doença. O estresse no retículo endoplasmático desempenha um papel significativo na origem e progressão do diabetes. Diversos fatores, como alterações no metabolismo de glicose e lipídios, estresse oxidativo, elevação de fatores inflamatórios e disfunções nas vias de sinalização da insulina, podem desencadear o estresse do retículo endoplasmático. Esses fatores podem atuar de forma isolada ou em conjunto, além de interagir de maneiras complexas com o ERE, intensificando o desenvolvimento do diabetes. Assim, o ERE exerce uma função reguladora essencial do processo patológico do DM2 (Chen *et al.*, 2024).

A RI é uma fase inicial no desenvolvimento do DM2 e pode ser desencadeada por ERE (Saltiel, 2021). Segundo Lee *et al.*, o ERE é uma causa de resistência à insulina no fígado e nas células β pancreáticas (Lee *et al.*, 2022). Além disso, Coskun *et al.*, identificaram que, em ratos com RI, os níveis de marcadores do ERE, como ATF4, ATF6, PERK e IRE1 α , estavam significativamente mais elevados em comparação com ratos normais (Coskun, 2020). Portanto, o ERE pode estar envolvido no surgimento da resistência à insulina, possivelmente por meio da alteração da estrutura das membranas mitocondriais, e de vias como PERK-eIF2 α , IRE1-XBP1 e ATF6 (Chen *et al.*, 2024).

O ERE pode aumentar a expressão do gene *DNA damage response* (REDD1) através da via PERK-eIF2 α -ATF4, induzindo assim a RI (Regazzetti *et al.*, 2010; Vega-Rubin-De-Celis *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2020). REDD1 é um gene de resposta ao estresse celular que desempenha um papel regulador em processos fisiológicos importantes, como o crescimento celular, o metabolismo e a autofagia. Em um estudo conduzido por Whitney *et al.* em fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) com diferentes genótipos (PERK+/+, PERK -/-, ATF4+/+ e ATF4 -/-), foi demonstrado que a fosforilação sequencial de PERK e eIF2 α promovida pelo ERE resultou no aumento da expressão da proteína ATF4, um fator de transcrição essencial para a elevação de REDD1 (Kimball; Jefferson, 2012; Whitney *et al.*, 2009). Kimball *et al.* verificaram que a indução do ERE, utilizando um indutor específico, aumentou significativamente a expressão de REDD1 foram inibidas no fígado de camundongos com depleção de PERK (Kimball; Jefferson, 2012). Em outro estudo, Moore *et al.* induziram ERE em células de Müller da retina com glicose e observaram um aumento significativo na expressão de REDD1 e na indução de RI nas células. Esses experimentos sugerem que o ERS

pode induzir resistência à insulina ao aumentar a expressão de REDD1 através da via PERK-eIF2 α -ATF4 (Moore *et al.*, 2016).

O REDD1 contribui para a resistência à insulina ao suprimir a atividade do complexo mTORC1, o que resulta na fosforilação da serina em IRS1 e na inibição da ativação de S6K1 na via de sinalização da insulina. Estudos indicam que a insulina aumenta a expressão de REDD1 em adipócitos, diminuindo a fosforilação de S6K1, o que pode comprometer a sinalização da insulina e induzir RI (Lamming *et al.*, 2012; Regazzetti *et al.*, 2010). Além disso, pesquisas mostram que níveis elevados de REDD1 inibem o mTORC1, reduzindo a sensibilidade à insulina nos músculos e induzindo RI em pacientes diabéticos durante o clamp euglicêmico hiperinsulinêmico (Williamson *et al.*, 2015).

A via de sinalização IRE1 α -XBP1 desencadeia resistência à insulina (RI) durante o estresse do retículo endoplasmático (ERE) ao promover a fosforilação de serina do IRS1, o que interfere na sinalização da insulina. Em condições normais, o IRS1 é fosforilado em resíduos de tirosina, ativando a via PI3K-AKT, responsável pela captação e metabolismo da glicose. No entanto, durante o ERE, ocorre a desfosforilação dos resíduos de tirosina do IRS1 e a fosforilação em resíduos de serina por um mecanismo dependente de JNK, o que prejudica a sinalização da insulina, resultando em RI e diabetes (Ozcan *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2016).

Estudos indicam que, em fígados de ratos com diabetes tipo 2 (DM2), os níveis de marcadores do ERE, como IRE1 α e XBP1, estão elevados, acompanhados por um aumento na fosforilação de serina do IRS1 e uma redução na sensibilidade à insulina (Tang *et al.*, 2018). Além disso, a pesquisa de Özcan *et al.* demonstrou que fibroblastos de camundongos deficientes em XBP1 apresentaram um aumento na fosforilação de serina do IRS1, junto com níveis elevados de ERE e RI. No entanto, quando a expressão de XBP1 foi restaurada nesses fibroblastos, houve um aumento significativo na fosforilação de tirosina do IRS1 e uma redução na fosforilação de serina, o que melhorou a sinalização da insulina e reduziu tanto o ERE quanto a RI. Esses achados destacam que o ERE pode aumentar a fosforilação de serina do IRS1 através da via IRE1 α -XBP1, suprimindo a sinalização da insulina e promovendo a resistência à insulina. Portanto, manter a expressão adequada de XBP1 é crucial para regular a resistência à insulina (Ozcan *et al.*, 2004).

A interferência na sinalização da insulina pelo estresse do retículo endoplasmático (ERE) através da via ATF6 pode levar à resistência à insulina. De acordo com Wang *et al.*, o ATF6, durante o ERE, eleva a expressão da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), um regulador negativo da sinalização da insulina. Esse aumento contribui para a inibição da ativação de quinases proteicas a jusante e da fosforilação de reguladores metabólicos, reduzindo

a capacidade de sinalização da insulina e favorecendo o desenvolvimento da RI (Wang *et al.*, 2009). Li *et al.* mostraram que o inibidor específico de PTP1B, LPMP, é capaz de reduzir significativamente os níveis de ERE, restaurar a fosforilação de tirosina do IRS1, aumentar a fosforilação de AKT a jusante, ativar a via de sinalização da insulina e diminuir a glicose sanguínea elevada. Esses estudos indicam que o ERE diminui a transdução do sinal de insulina ao promover a expressão de PTP1B por meio do ATF6, o que acaba resultando na resistência à insulina (Li, D. *et al.*, 2021).

A produção insuficiente de insulina é um dos principais aspectos patológicos do DM2. O ERE compromete tanto a síntese quanto a liberação de insulina por meio de diversas via, como PERK-eIF2 α , IRE1 α -XBP1/RIDD, alterações nos níveis de Ca²⁺ e apoptose nas células β , entre outros (Chen *et al.*, 2024).

A exposição contínua ao ERE pode reduzir a atividade de PERK, bloquear a sinalização da via PERK-eIF2 α , diminuir a sensibilidade à insulina, e desencadear o dobramento incorreto da pró-insulina, resultando em uma produção inadequada de insulina, hiperglicemia e diabetes. Estudos diversos investigaram o impacto da PERK e eIF2 α nas células β do pâncreas e na secreção da insulina. Liu *et al.* identificaram que a ausência ou mutação de PERK e eIF2 α em células β pode alterar a formação das ligações dissulfeto da pró-insulina, aumentando o dobramento incorreto e comprometendo a secreção de insulina (Liu *et al.*, 2018). Harding *et al.* relataram que camundongos modificados geneticamente sem PERK desenvolvem hiperglicemia e sofrem apoptose das células β pancreáticas (Harding *et al.*, 2001). Além disso, Xu *et al.* evidenciaram que o ERE mediado por miR-204 pode prejudicar a via de sinalização PERK-eIF2 α , agravando a apoptose das células β e reduzindo a secreção de insulina. Esses resultados sugerem que o ERE induzido pela hiperglicemia contribui para o dobramento inadequado da pró-insulina e interfere na síntese e liberação de insulina através da via PERK-eIF2 α (Xu *et al.*, 2016).

O estresse do retículo endoplasmático (ERE) contínuo pode induzir a morte de células β e inibir a síntese e secreção de insulina através da via IRE1 α -XBP1, ativando a via CHOP. Lipson *et al.* expuseram células β pancreáticas a um ambiente de alta glicose e observaram um aumento significativo na expressão de marcadores do ERE, como BiP, Wfs1 (um gene alvo de IRE1 α), XBP1 e CHOP (Lipson *et al.*, 2006). Quando as células β foram submetidas a diferentes concentrações de glicose, os níveis de expressão de p-IRE1 α aumentaram proporcionalmente à concentração de glicose, enquanto o conteúdo de insulina inicialmente subiu, mas depois diminuiu. Esses resultados indicam que o ERE prolongado pode reduzir a síntese de insulina por meio da ativação excessiva de IRE1 α . Allagnat *et al.* relataram que a

superprodução de XBP1 compromete a secreção de insulina, reduz a expressão do gene da insulina, induz apoptose de células β e suprime a secreção de insulina. (Allagnat *et al.*, 2010) No entanto, o ERE prolongado por meio de IRE1 α regula negativamente o XBP1 spliced, o que, por sua vez, reativa IRE1 α em excesso, inibindo a secreção de insulina. Engin *et al.* relataram que durante a progressão do pré-diabetes para o diabetes, a expressão de XBP1 spliced inicialmente aumenta e, posteriormente, diminui (Engin *et al.*, 2013). Ann-Hwee Lee *et al.*, descobriram que a deficiência de XBP1 não só prejudica a resposta de RPD das células β , mas também leva à ativação excessiva do seu regulador upstream, IRE1 α , resultando na degradação de um subconjunto de mRNAs que codificam enzimas de processamento de pró-insulina. Isso resulta em função celular β comprometida e inibição da secreção de insulina em camundongos mutantes para XBP1. Esses achados sugerem que o ERE pode causar disfunção das células β e inibir a secreção de insulina via IRE1 α -XBP1 (Lee *et al.*, 2011).

A ativação excessiva e contínua de IRE1 α pode resultar em uma super-reação de RIDD. Como consequência, a via de sinalização JNK é ativada, o que inibe a fosforilação de IRS1. Essa interrupção na sinalização da insulina compromete a secreção de insulina e acaba levando à apoptose das células β . Pesquisas indicam que a ativação excessiva prolongada de IRE1 nos tecidos pancreáticos pode desencadear RIDD, provocar a morte das células β pancreáticas, e assim, inibir a secreção de insulina (Madhavan *et al.*, 2022; Ozcan *et al.*, 2004; Wang; Kaufman, 2016).

O cálcio (Ca^{2+}) desempenha um papel importante na promoção da secreção de insulina, facilitando o início e a fusão dos grânulos precursores de insulina à membrana plasmática das células β pancreáticas, o que contribui para a secreção de insulina (Lv *et al.*, 2022). Bloqueadores dos canais de cálcio (BCCs) foram descobertos como redutores do risco de hipoglicemia grave em pacientes com hiperinsulinemia, indicando que o Ca^{2+} estimula a secreção de insulina pelas células β (Nam *et al.*, 2021). Enquanto um nível adequado de ERE aumenta a concentração de Ca^{2+} intracelular, o ERE prolongado provoca um rápido aumento nos níveis de Ca^{2+} , exacerbando o próprio ERE, promovendo a apoptose das células β e reduzindo a secreção de insulina. Estudos de Zhang *et al.* e Li *et al.* mostram que o ERE prolongado desestabiliza a homeostase de cálcio no RE, diminuindo o Ca^{2+} no RE e aumentando os níveis citoplasmáticos, o que inibe a secreção de insulina (Li, L. *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2023). Sabatini *et al.* demonstraram que estimulação crônica de Ca^{2+} amplifica o ERE, levando à disfunção das células β e suprimindo a síntese e secreção de insulina (Sabatini *et al.*, 2019). Berra-Romani *et al.* também relataram que a atividade reduzida da Ca^{2+} -ATPase em células endoteliais da aorta de ratos com DM2 eleva a concentração de Ca^{2+} citoplasmático,

promove ERE, induz apoptose das células β e inibe a secreção de insulina. Esses resultados sugerem que o ERE prolongado pode ativar excessivamente a sinalização de Ca^{2+} , comprometendo as células β e inibindo a secreção de insulina (Berra-Romani *et al.*, 2019).

A apoptose das células β pancreáticas é um dos principais fatores responsáveis pela secreção insuficiente de insulina. O estresse do retículo endoplasmático (ERE) e a resposta à proteína mal dobrada (RPD), ambos induzidos pela hiperglicemia, estão associados à disfunção e apoptose das células β em casos de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Engin *et al.*, 2014; Kilanowska; Ziółkowska, 2022; Yang *et al.*, 2022). O ERE é um dos principais mecanismos que levam à apoptose celular, resultando na secreção inadequada de insulina pela células β pancreáticas (Shahrestanaki *et al.*, 2019). A morte celular programada provocada por ERE prolongado é a principal forma de apoptose das células β , e as vias de sinalização envolvidas nesse processo incluem a via da c-Jun N-terminal quinase (JNK), a via PERK/eIF2 α /ATF/CHOP, a via das capases, a via PI3K/Akt/GSK3 β , entre outras (Chen *et al.*, 2024).

As quinases N-terminal de c-Jun (JNKs), integrantes da família das quinases ativadas por mitógenos (MAPK), desempenham um papel fundamental na mediação da apoptose das células β pancreáticas e na regulação da secreção de insulina (Pu *et al.*, 2021). Durante o estresse do retículo endoplasmático (ERE), sensores como IRE1 α e PERK ativam diretamente a via MAPK, resultando na fosforilação da JNK (Urano *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2023). Em seguida, a JNK fosforilada (p-JNK) ativa uma série de fatores de transcrição pró-apoptóticos, como c-Jun, ATF2, e proteínas da família das caspases, o que reduz a expressão de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2, culminando na apoptose celular (El-Kashef; Sewilam, 2023; Fung *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2023). Além disso, o ERE pode reduzir a sensibilidade à insulina através da ativação da via JNK, inibindo a fosforilação de tirosina do IRS1 e interrompendo a sinalização de insulina, o que provoca resistência à insulina (RI) e apoptose celular (Khalid *et al.*, 2022). Brozzi *et al.* mostraram que, durante o ERE, o IRE1 α promove a fosforilação da JNK via TRAF2, facilitando a transição de uma resposta adaptativa para uma resposta apoptótica ao ERE, resultando na morte das células β (Brozzi *et al.*, 2015). Liang *et al.* demonstraram que o extrato polissacarídico de *Ganoderma lucidum* melhora a secreção de insulina em células INS-1 ao inibir a fosforilação da JNK (Liang *et al.*, 2020). Pu *et al.* identificaram que o fator NR4A1 pode reduzir a apoptose induzida por ERE em células β pancreáticas ao aumentar a expressão do regulador negativo MKP7 na via MAPK, enfraquecendo assim a fosforilação da JNK. Esses resultados indicam que a via JNK desempenha um papel crucial na apoptose de células β induzida por ERS (Pu *et al.*, 2021).

CHOP (proteína homóloga ao C/EBP-10) é um fator de transcrição fundamental na apoptose celular mediada pelo estresse do retículo endoplasmático (ERE). Durante o ERE a expressão de CHOP aumenta substancialmente. A sinalização prolongada do ERE via PERK-eIF2 α promove a síntese de ATF4, enquanto ATF4 e ATF6 se ligam ao promotor de CHOP, ativando sua expressão. Como resultado, a apoptose celular é desencadeada pela elevação das proteínas pró-apoptóticas Bim e NOXA. Portanto, PERK e ATF6 têm papéis importantes na indução da expressão da CHOP (Yang *et al.*, 2022).

Sob condições de estresse do retículo endoplasmático (ERE), a fosforilação de eIF2 α , mediada por PERK, eleva os níveis de mRNA de ATF4, promovendo a ativação do promotor da CHOP e facilitando sua transcrição e expressão. Além disso, ATF6, atuando como fator de transcrição no citoplasma, também induz a expressão do gene CHOP, levando à apoptose celular. O uso de 4-PBA ou a transfecção com siRNA para CHOP reduz de forma significativa os níveis de expressão de CHOP em células β pancreáticas, diminuindo a apoptose celular (Huang *et al.*, 2021). A deleção do gene CHOP em células β pode mitigar o ERE em camundongos e reduzir a apoptose induzida pelo ERE nessas células. Esses resultados sugerem que o ERE, através da ativação da via CHOP por ATF4 e ATF6, aumenta a expressão de proteínas pró-apoptóticas enquanto diminui a expressão de proteína antiapoptóticas, intensificando assim a apoptose (Yong *et al.*, 2021).

A via das caspases desempenha um papel fundamental na apoptose de células β . O estresse do retículo endoplasmático (ERE) pode desencadear três vias apoptóticas distintas: uma via exógena dependente de caspase-8, uma via mitocondrial dependente de caspase-9 e uma via do retículo endoplasmático dependente de caspase-12. Todas essas vias convergem para a ativação da caspase-3, uma enzima efetora que culmina na apoptose celular. Estudos demonstraram que o ERE contínuo pode ativar a caspase-8, levando à morte das células β pancreáticas, reduzindo a secreção de insulina e agravando a hiperglicemia (Zhang *et al.*, 2023). A hiperglicemia e a desregulação da homeostase do cálcio em pacientes diabéticos ativam a via mitocondrial de apoptose em células β , resultando em resistência à insulina e apoptose. A terapia prolongada com insulina pode ativar a caspase-12, promovendo a apoptose mediada por ERE, enquanto a inibição da caspase-12 protege as células β dessa morte (Rachdaoui, 2020; Shahrestanaki *et al.*, 2019). Wang *et al.* verificaram que a superexpressão de caspase-3 induz danos mitocondriais e apoptose de células β . Entretanto, o Om Santal Adivasi (OSA®), um extrato de planta com propriedades antidiabéticas, pode proteger essas células da apoptose induzida por citocinas ao reduzir os níveis de mRNA de caspase-3. Esses achados sublinham a

importância da via de sinalização das caspases na apoptose de células β pancreáticas causada pelo ERE (Wang *et al.*, 2018).(Wang *et al.*, 2018).

A via de sinalização PI3K/Akt/GSK3 β é essencial para mediar os efeitos apoptóticos do estresse do retículo endoplasmático (ERE) nas células β . A insulina regula o metabolismo da glicose através da ativação da via PI3K/Akt, e a GSK3 β , uma quinase serina/treonina, pode provocar apoptose das células β pancreáticas quando sua atividade é aumentada. Em condições normais, essa via sinaliza a fosforilação da GSK3 β , o que inibe sua atividade, mantendo assim a função normal e a sobrevivência das células β . Contudo, o ERE impede a sinalização PI3K/Akt, levando à desfosforilação e ativação da GSK3 β , resultando na elevação de proteínas pró-apoptóticas como Bax, Bad, e caspases, que iniciam a apoptose das células β (Chen *et al.*, 2024). Além disso, a GSK3 β também interfere na sinalização do receptor de insulina; quando ativada, reduz a fosforilação de IRS1, comprometendo a transdução dos sinais de insulina, o que prejudica a absorção de glicose, a síntese de glicogênio, e outras funções metabólicas importantes, culminando em resistência à insulina (RI) (Cai *et al.*, 2022). Diversos estudos revelaram conexões entre a apoptose de células β induzida por ERS e a modulação de vias de sinalização como Akt e GSK3 β . Srinivasan *et al.* demonstraram uma ligação entre a redução de p-Akt e p-GSK3 β e a apoptose de células β induzida por ERE (Srinivasan *et al.*, 2005). Lin *et al.* associaram a via Akt/GSK3 β /Nrf2 à disfunção e apoptose das células INS-1 em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (Lin *et al.*, 2022). Macaulay *et al.* identificaram que inibidores de GSK3 β podem reduzir a apoptose, aumentar a proliferação de células β , e proporcionar proteção geral. Assim, durante o desenvolvimento do diabetes, o ERE contribui para a apoptose de células β pancreáticas via PI3K/Akt/GSK3 β (Macaulay; Woodgett, 2008).

O ERE pode impactar negativamente o início e a progressão do DM2 ao induzir processos como autofagia celular, inflamação e metabolismo lipídico. Enquanto a autofagia moderada pode ajudar a inibir o diabetes, um ERE prolongado e intenso pode levar à autofagia do RE. O excesso de ERE compromete a autofagia normal, resultando em RI e morte das células β . Estudos indicam que o ERE hiperativo e a autofagia comprometida estão associados à aterosclerose em pacientes diabéticos. Diversas pesquisas sugerem que uma abordagem promissora para o tratamento do DM2 seria proteger as células β através da inibição do ERE e da prevenção da autofagia excessiva (Jin *et al.*, 2022; Li; Guo, 2022; Luo *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2019). Além disso, o ERE pode contribuir para o desenvolvimento e progressão do DM2 ao estimular a resposta inflamatória. O ERE provoca a produção de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-6 e IL-1 β por meio das vias NF- κ B e JNK, entre outras. Essa interferência na

sinalização da insulina causa RI e prejudica as células β (Li *et al.*, 2020). Pesquisas têm mostrado que o ERE e a interação entre o ERE e proteína interagente da tioredoxina (TXNIP) estão envolvidos na via inflamatória associada ao desenvolvimento do diabetes e suas complicações. Além disso, o ERE pode afetar a diferenciação e o metabolismo das células adiposas, inibindo a síntese de glicogênio e o transporte de glicose, aumentando os níveis de ácidos graxos livres, diminuindo a sensibilidade à insulina e suprimindo a captação e utilização de glicose, o que leva à RI e, eventualmente, ao DM2 (Domingues *et al.*, 2021; Shao *et al.*, 2016).

Como visto, no DM2, o ERE desempenha um papel central na disfunção das células β e na RI, exacerbando as complicações metabólicas associadas à doença. Essa ligação direta entre o ERE e o DM2 sugere que a modulação desse estresse pode ser uma estratégia terapêutica promissora.

2.2.4 Relevância do Estresse do RE na DHGNA

O acúmulo de lipídios nos hepatócitos desencadeia estresse do retículo endoplasmático (RE) por três mecanismos principais. O primeiro envolve alterações na composição das membranas do RE, perturbando a homeostase do Ca^{2+} . O excesso de lipídios aumenta a razão fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina, os fosfolípidos mais abundantes, o que interfere na estrutura da membrana, reduz a fluidez e prejudica a atividade das bombas de Ca^{2+} -ATPase, diminuindo o Ca^{2+} no RE (Hyslop *et al.*, 1982; Kim *et al.*, 2011). Esse mecanismo é considerado uma das principais causas de estresse do RE induzido por lipídios, pois muitas chaperonas dependem desse íon para realizar o enovelamento correto de proteínas (Arruda; Hotamisligil, 2015; Fu *et al.*, 2011). O segundo mecanismo ocorre pelo aumento na síntese de proteínas como perilipina-2 e apolipoproteína B100, necessárias para a formação de gotas lipídicas e VLDL, resultando em proteínas desenoveladas e ativando a resposta a proteínas mal enoveladas (RPD) (Lee *et al.*, 2012; Shelness *et al.*, 1999). O terceiro mecanismo está na ativação direta dos lipídios, já que ácidos graxos saturados, como o palmitato, podem ativar diretamente as proteínas PERK e IRE1, mesmo sem a presença de proteínas mal enoveladas (Promlek *et al.*, 2011; Volmer *et al.*, 2013).

Além de ser induzido pelo acúmulo de lipídios, o estresse do RE contribui para a manutenção e progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Entre os mecanismos, destaca-se a lipogênese de novo, ativada principalmente pela ingestão de carboidratos que, ao estimularem a liberação de insulina, promovem a expressão de genes

lipogênicos via SREBP1c (Ferre; Foufelle, 2010; Wang *et al.*, 2015). Este fator de transcrição, normalmente retido na membrana do RE, é liberado após estímulo pela insulina, sendo transportado ao complexo de Golgi, onde é clivado e ativado para promover a síntese de ácidos graxos. Curiosamente, mesmo em resistência hepática à insulina, a atividade do SREBP1c se mantém elevada, o que pode ser explicado pelo estresse crônico do RE, que induz a clivagem de SREBP1c independentemente da insulina. Esse efeito é atenuado pela superexpressão da chaperona GRP78, que reduz a clivagem de SREBP1c e a expressão de enzimas lipogênicas, melhorando a esteatose e resistência insulínica (Xu *et al.*, 2013).

A RPD também pode indiretamente induzir lipogênese de novo por ativação de IRE1 e PERK. O IRE1, ao promover a produção de XBP1s, aumenta diretamente a expressão de enzimas lipogênicas e estimula a SREBP1c, promovendo a exportação de triglicerídeos (hipertrigliceridemia) e a formação de VLDL pela elevação da expressão de PDI e MTTP. No caso de PERK, estudos indicam que sua deleção reduz a lipogênese de novo, enquanto a defosforilação da eIF2 α ou a deleção de ATF4 protegem o fígado contra a esteatose induzida por dietas ricas em gordura ou frutose. A ativação da via PERK-ATF4 também aumenta a expressão do receptor de VLDL, favorecendo a entrada de lipoproteínas no fígado e contribuindo para a progressão da DHGNA (Herrema *et al.*, 2016; Ning *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

Portanto, embora a RPD inicialmente funcione para reduzir o estresse do RE causado pelo excesso de lipídios, a falta de resolução desse acúmulo pode agravar o estresse do RE e perpetuar a lipogênese, criando um ciclo vicioso que intensifica a DHGNA e ativa vias inflamatórias e apoptóticas, piorando o quadro clínico (Jo *et al.*, 2013).

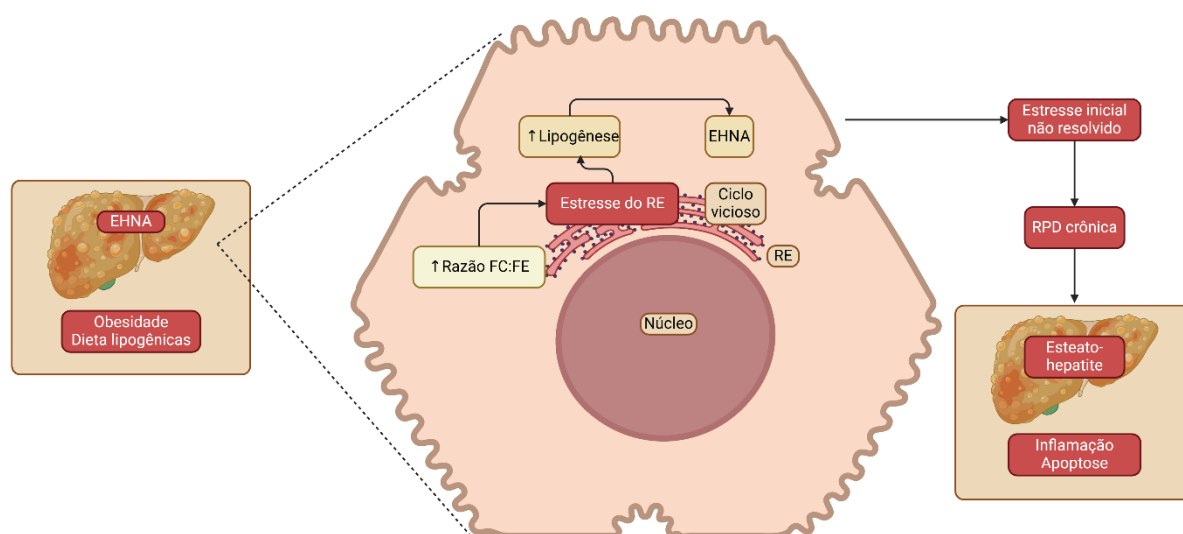


Figura 7. Estresse do retículo endoplasmático (RE) e a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). O acúmulo de lipídios no hepatócito decorrente da obesidade ou de dietas lipogênicas promove modificações na

composição da membrana do RE aumentando a razão fosfatidilcolona (FC):fosfatidietanolamina (FE), o que induz estresse do RE por alterações na homeostase do Ca^{2+} . A ativação da resposta a proteína desdobrada (RPD) tenta amenizar o acúmulo de gordura, mas se a sobrecarga lipídica não for diminuída, o estresse do RE torna o processo um ciclo vicioso por estimular lipogênese de novo. Isso contribui para a manutenção e progressão da DGHNA, o que pode evoluir para a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), caso esse ciclo não seja interrompido. Criado com Biorender

O estresse do retículo endoplasmático tem emergido como um fator importante na fisiopatologia do DM2 e da DHGNA, contribuindo para a disfunção das células β pancreáticas, esteatohepatite não-alcoólica e resistência à insulina. Portanto, explorar em detalhes o estresse do RE e suas implicações no DM2 e DHGNA é de fundamental importância para a compreensão de novas estratégias terapêuticas, como é o caso da espermidina, que será discutida nos próximos tópicos.

2.2.5 Modulação do Estresse do RE como Abordagem Terapêutica

Nos últimos anos, esforços significativos têm sido direcionados para o desenvolvimento de novas moléculas capazes de prevenir o estresse do retículo endoplasmático (RE) e promover a sua homeostase. Tais moléculas demonstraram eficácia em melhorar o metabolismo da glicose, a função endotelial e ação da insulina no contexto do diabetes (Sarvani *et al.*, 2017). Dessa forma, intervenções farmacológicas que visam as vias da RPD e o estresse do RE, como o ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) e fenilbutirato de sódio (SPB), classificadas como moléculas chaperonas, podem ser aplicadas no tratamento dessas condições. Essas chaperonas auxiliam na capacidade de dobramento de proteínas no RE, regulando o estresse e interferindo nas vias de sinalização relacionadas aos sensores PERK, IRE1 e ATF6 (Mustapha *et al.*, 2021).

A Food and Drug Administration aprovou o uso de chaperonas moleculares, como SPB e TUDCA, para melhorar a homeostase do RE e reduzir o estresse do RE (Chen, J. *et al.*, 2018). Medicamentos anti-hipertensivos, como o Guanabenz, também foram aprovados para essa finalidade (Maamoun *et al.*, 2019). Adicionalmente, algumas moléculas são capazes de ativar o GRP78 em modelos animais. Zhang *et al.* (2011) demonstraram que o uso de ácido valpróico em modelos isquêmico protege células epiteliais contra a morte celular, aumentando a expressão do GRP78, reduzindo a expressão de CHOP e ativando enzimas caspases (Zhang; Ren, 2011).

Tsaytler *et al.* relataram que o Guanabenz, um agonista do receptor adrenérgico α_2 , prolonga a estimulação do eIF2 α ao inibir sua desfosforilação através da inibição seletiva da fosfatase GADD34 (Tsaytler *et al.*, 2011). Outro estudo indicou que o telmisartan, um

bloqueador do receptor de angiotensina, pode prevenir a morte celular por meio da via IRE1 α (Tong *et al.*, 2016). Xu *et al.* apontaram que o verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio, utilizado em células de ilhotas pancreáticas e modelos murina de DM2, pode inibir genes pró-apoptóticos. A exploração futura dos bloqueadores de canais de cálcio pode validar seu potencial para inibir os três sensores principais do ERE (Xu *et al.*, 2012).

A modulação do ERE tem sido explorada como uma abordagem terapêutica inovadora para o tratamento do DM2. Entre os compostos promissores, destaca-se a espermidina, uma poliamina que têm demonstrado potencial em aliviar o estresse do RE. No próximo tópico exploraremos o papel da espermidina na modulação do ERE e suas possíveis aplicações terapêuticas no DM2.

2.3 Poliaminas e Espermidina

2.3.1 Introdução às Poliaminas

As poliaminas (PAs), como putrescina (PUT), espermina (SPE) e espermidina (ESP) são alquilaminas orgânicas com características policatiônicas, sendo sintetizadas a partir da L-ornitina ou pela descarboxilação de aminoácidos (Firpo; Mounce, 2020; Handa *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2017). Elas estão presentes em todas as células vivas, e as células de mamíferos possuem uma concentração milimolar dessas PAs (Pegg, 2016). A espermina foi identificada pela primeira vez em 1678, por Van Leeuwenhoek, como cristais presentes em sêmen seco, mas não em sêmen fresco. Em 1791, Vauquelin constatou que esses cristais eram compostos derivados de um fosfato desconhecido. Posteriormente, em 1878, Schreiner classificou a SPE como um composto básico, e em 1888, Ladenburg e Abel propuseram o nome de “espermina” para essa substância (Ladenburg; Abel, 1888; Schreiner, 1878). Uma década depois, em 1898, Poehl sugeriu o uso da SPE no tratamento de várias doenças. Em 1924, Rosenheim conseguiu sintetizar SPE, ESP e PUT, o que marcou o início da ciência moderna das poliaminas (Poehl; Poehl, 1898; Rosenheim, 1924). Além disso, a PUT foi descoberta em microrganismos por volta de 1800, e a ESP foi identificada no século XX (Gerner; Meyskens Jr, 2004).

Foi descoberto que as PAs desempenham vários papéis bioquímicos importantes, incluindo a síntese, funcionamento, manutenção e estabilidade de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e proteínas (Park, 2006). Elas também são fundamentais na sinalização celular, na ligação ao DNA, na transcrição, no *splicing* de RNA, no funcionamento dos citosequeletos e na tradução eucariótica, promovendo o amadurecimento do fator de iniciação de tradução

(eIF5A) (Flynn; Hogarty, 2018; Hesterberg *et al.*, 2018; Mathews; Hershey, 2015; Pällmann *et al.*, 2015; Thomas; Thomas, 2018). A atividade das PAs é principalmente determinada pelo número de grupos amino carregados positivamente ligados a cada uma delas. Uma carga positiva mais alta indica uma maior atividade de interação com íons celulares (Moinard *et al.*, 2005). Por exemplo, a espermina (SPE) é altamente ativa devido aos seus quatro grupos amino carregados positivamente, enquanto a putrescina (PUT) apresenta menor atividade de interação, com apenas dois grupos amino (Lenis *et al.*, 2017).

Estudos genômicos indicam que as PAs regulam vias metabólicas celulares, o que facilita a formação de compartimentos subcelulares, como citoplasma, mitocôndrias e núcleo (Handa *et al.*, 2018). Biologicamente, as PAs e seus análogos estão envolvidos em diversos processos de saúde e doenças humanas, incluindo gastroenterologia, oncologia, estresse oxidativo, derrames cerebrais, parasitologia, apoptose, obesidade, asma, e outras patologias (Bacchi; Yarlett, 2002; Cai *et al.*, 2015; Casero Jr; Marton, 2007; Handa *et al.*, 2018; Jain, 2018; Jell *et al.*, 2007; Massaro *et al.*, 2017; Pfeffer *et al.*, 2001; Pignatti *et al.*, 2004; Tomitori *et al.*, 2005).

Há três formas de manter o pool de PAs no corpo: pelos microrganismos intestinais, pela biossíntese de novo (endógena) e pelo fornecimento por meio da dieta (exógena). Esses mecanismos atuam simultaneamente na regulação da síntese, do catabolismo e do transporte das concentrações intracelulares de PAs. No entanto, a dieta exógena é a principal fonte de PAs, superando o processo de biossíntese endógena. Portanto, as poliaminas presentes nos alimentos desempenham um papel fundamental na manutenção da biossíntese de PAs, pois alterações no metabolismo das poliaminas podem resultar em diversos problemas de saúde. Entre as poliaminas presentes nas células vivas, destaca-se a espermidina com características únicas que exerce múltiplas funções biológicas. (Averill-Bates *et al.*, 2005).

2.3.2 Funções e Importância da Espermidina

A espermidina é uma poliamina natural de baixo peso molecular amplamente presente em diversos organismos (Madeo *et al.*, 2020a). O fato de possuir três grupos amino carregados positivamente é uma característica estrutural essencial para suas funções, como estabilização do DNA, promoção do crescimento celular e indução da autofagia (Madeo *et al.*, 2020a). O fato de possuir três grupos amino carregados positivamente é uma característica estrutural essencial para suas funções, como estabilização do DNA, promoção do crescimento celular e indução da autofagia (Eisenberg *et al.*, 2009; García-Prat *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2013; Madeo *et al.*,

2018; Zhang *et al.*, 2021). Por ser um indutor natural da autofagia, a espermidina demonstrou múltiplos benefícios para a saúde, incluindo prolongamento da vida útil, inibição de tumores, proteção cardiovascular e efeitos neuromoduladores. Como resultado, a espermidina e os alimentos ricos nesse composto têm atraído grande interesse em pesquisas ao redor do mundo nos últimos anos (Bhukel *et al.*, 2017; Kiechl *et al.*, 2018; Ridler, 2017).

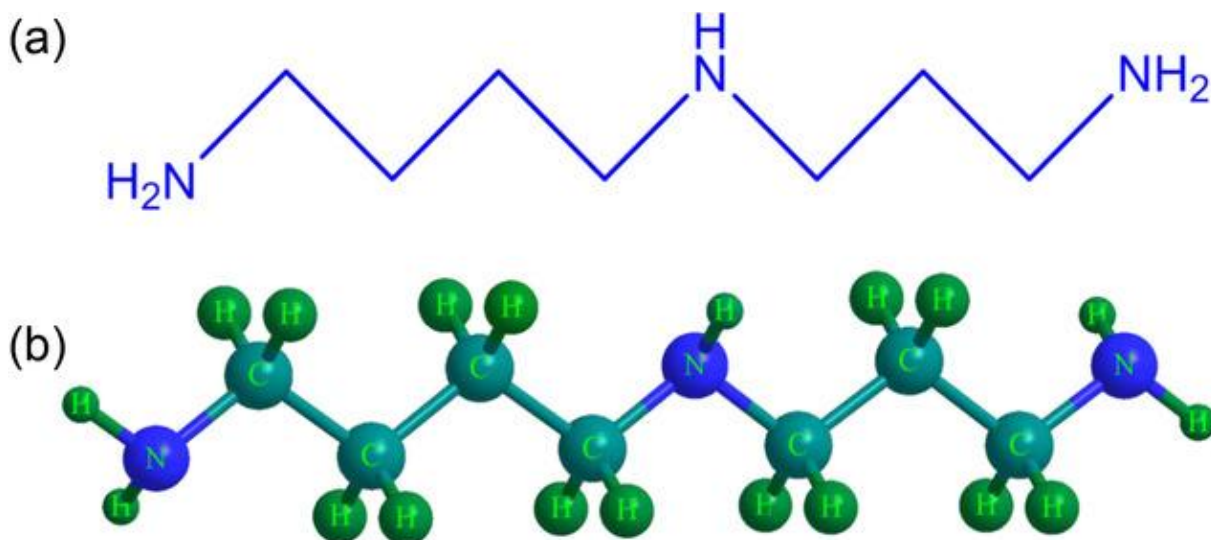


Figura 8. Estrutura (a) e estereoestrutura (b) da espermidina. Fonte: Zou et al., 2022.

A espermidina atua como um indutor natural de autofagia e composto antienvelhecimento que compartilha muitas características benéficas com a restrição calórica e, portanto, pode ser considerada um mimético de restrição calórica. A autofagia é um processo fundamental para manter a homeostase energética celular e promover a sobrevivência das células em condições de estresse, por meio da degradação de componentes intracelulares (Chen *et al.*, 2014; Levine; Kroemer, 2019; Rubinsztein *et al.*, 2011). Este mecanismo afeta diversos processos biológicos, desde o desenvolvimento até o envelhecimento (Hansen *et al.*, 2018). A autofagia exerce um papel adaptativo crucial na proteção contra várias patologias, como envelhecimento, câncer, neurodegeneração e doenças cardíacas (Levine; Kroemer, 2008; Zhang; Simon, 2020). Como um indutor natural da autofagia, a espermidina apresenta múltiplos efeitos benéficos à saúde, incluindo a extensão da longevidade, inibição de tumores, proteção cardiovascular, neuromodulação e efeitos anti-inflamatórios (Zhang; Simon, 2020).

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos da extensão da longevidade pela suplementação dietética da espermidina em leveduras e diferentes modelos animais (Eisenberg *et al.*, 2016; Eisenberg *et al.*, 2009; Filfan *et al.*, 2020). Eisenberg et al. observaram que a administração de espermidina promoveu uma significativa extensão da longevidade em organismo como leveduras, moscas, vermes e células imunológicas humanas. A espermidina causa a desacetilação da histona H3 na cromatina, ativando a autofagia, o que é apontado como

principal fator para o aumento da longevidade (Eisenberg *et al.*, 2016; Eisenberg *et al.*, 2009). Além disso, estudos indicam que a administração oral de espermidina prolonga a vida de camundongos devida à melhora da autofagia cardíaca, mitofagia e respiração mitocondrial. Em humanos, um estudo observacional sugere que indivíduos longevos (nonagenários e centenários) possuem níveis de poliaminas no sangue semelhantes aos de indivíduos de meia-idade, indicando um possível papel da espermidina na longevidade (Pucciarelli *et al.*, 2012).

Poliaminas são fundamentais para a proliferação e desenvolvimento celular, e a espermidina desempenha um papel chave como agente anticâncer (Madeo *et al.*, 2018). Assim como outros indutores de autofagia, como a rapamicina ou a metformina, a espermidina potencializa diretamente a função dos linfócitos de memória na eliminação de células cancerígenas (Pearce *et al.*, 2009). Em estudos com camundongos, Yue *et al.* observaram que a administração de espermidina diminuiu o grau de fibrose hepática e a incidência de câncer de fígado (Yue *et al.*, 2017). Além disso, Miao *et al.* sugerem que regular os macrófagos para aumentar a produção de espermidina pode ser uma estratégia promissora para inibir o crescimento do câncer colorretal (Miao *et al.*, 2016). Em humanos, um estudo epidemiológico prospectivo indicou que uma maior ingestão de espermidina na dieta está associada a uma redução na mortalidade específica por câncer (Kiechl *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, a espermidina tem sido reconhecida por seus efeitos protetores no sistema cardiovascular (Kiechl *et al.*, 2018; Tong; Hill, 2017). A partir de dados públicos de 48 países ocidentais, Soda *et al.* investigaram a relação entre a ingestão de poliaminas e a mortalidade causada por doenças cardiovasculares, demonstrando que a ingestão de espermidina estava inversamente correlaciona com a mortalidade. Estudos de Eisenberg *et al.* indicam que a suplementação de espermidina pode prevenir o envelhecimento do coração e melhorar a função diastólica, a elasticidade do ventrículo esquerdo e a função mitocondrial em camundongos idosos, fortalecendo a evidência de que a ingestão de espermidina está associada à menor mortalidade por doenças cardiovasculares (Soda *et al.*, 2012). No modelo de ratos hipertensos sensíveis ao sal, a suplementação de espermidina retardou o desenvolvimento de doenças cardíacas hipertensivas e reduziu a pressão arterial. Portanto, a espermidina demonstrou efeitos protetores significativos no sistema cardiovascular (Eisenberg *et al.*, 2017).

Em camundongos, a administração oral de espermidina melhorou a função visual ao estimular a regeneração do nervo óptico, reduzir a desmielinização óptica e diminuir a quantidade de células ganglionares da retina (Noro *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016). Em *Drosophila*, a ingestão de espermidina retardou o declínio da memória olfativa relacionado à idade por meio da indução de autofagia e preveniu o comprometimento da memória associado

ao envelhecimento, interagindo com a zona ativa pré-sináptica da sinapse (Gupta *et al.*, 2016; Sigrist *et al.*, 2014). Em humanos, um ensaio clínico piloto, randomizado, controlado por placebo e duplo-cego, realizado durante três meses, revelou que a espermidina oral teve um efeito positivo na memória de adultos mais velhos com declínio cognitivo subjetivo (Wirth *et al.*, 2018). Adicionalmente, estudos com idoso também demonstraram que uma ingestão elevada de espermidina está associada a melhorias em vários parâmetros estruturais do cérebro, como o volume do hipocampo e a espessura cortical, sugerindo benefícios potenciais para a saúde cerebral (Schwarz, C. *et al.*, 2020).

A espermidina, atuando como antioxidante, demonstrou efeitos anti-inflamatórios significativos em casos de lesões hepáticas, colite e inflamação respiratória. Em estudos com camundongos, a administração de espermidina preveniu lesões hepáticas e estresse oxidativo induzidos por etanol e LPS, possivelmente devido à redução de espécies reativas de oxigênio e à peroxidação lipídica. Além disso, análises de expressão gênica indicaram que a espermidina inibiu a formação de citocinas pró-inflamatórias e a fibrose hepática (Adhikari *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020; Ma; Ni; Yang; *et al.*, 2021).

Estudos recentes sugerem que a administração de espermidina pode ajudar a reduzir o ganho de peso e as complicações relacionadas à obesidade. Ma *et al.* identificaram uma correlação negativa entre o consumo de espermidina e a obesidade em humanos e camundongos. Utilizando dados da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição e um banco de dados nutricional, uma análise de correlação de Pearson mostrou que a ingestão de espermidina em humanos estava negativamente correlacionada com vários parâmetros associados à obesidade como índice de massa corporal, circunferência da cintura, resistência à insulina, níveis de insulina em jejum e glicose sérica em jejum (Ma *et al.*, 2020). Em camundongos obesos induzidos por dieta, a suplementação com espermidina resultou em perda de peso e melhora da resistência à insulina, Wang *et al.* relataram que a espermidina administrada oralmente reduziu significativamente a obesidade, a resistência à insulina e a esteatose hepática em camundongos alimentados com uma dieta rica em gorduras, devido à ativação do tecido adiposo marrom e à adaptação metabólica do músculo esquelético induzidas pela espermidina. Assim, a espermidina oral apresenta potencial para prevenir ou tratar a obesidade e suas complicações associadas. Contudo, são necessárias mais pesquisas para determinar as dosagens adequadas e a segurança da espermidina antes de seu uso clínico. Dadas essas propriedades, a espermidina também tem sido investigada por seus potenciais benéficos no manejo de doenças metabólicas, especialmente no contexto do DM2 (Wang, Y. *et al.*, 2021).

2.3.3 Espermidina e Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)

No contexto do DM2, a espermidina tem demonstrado efeitos promissores. Pesquisas anteriores em modelos de roedores indicaram que a espermidina pode influenciar a homeostase da glicose (Kulkarni *et al.*, 2022). Camundongos mutantes com níveis aumentados de espermidina apresentaram níveis mais baixos de glicose no sangue em comparação com os controles, sugerindo que a espermidina pode oferecer proteção contra o DM2 induzido por dieta (Anderson *et al.*, 2015). Além disso, o aumento da hemoglobina glicada (HbA1C) em ratos diabéticos foi interrompido com o tratamento com espermidina (Méndez; Balderas, 2006). A administração diária de espermidina a camundongos com dieta rica em gordura também melhorou a intolerância glicose, a resistência à insulina e a hiperinsulinemia. Em consonância com esses resultados em animais, dados da ingestão dietética de espermidina em uma população geral do National Health and Nutrition Survey (NHANES) de 2009 a 2010 mostraram uma associação negativa com os níveis de glicose sérica, insulina, HbA1C e o índice HOMA-IR (Ma *et al.*, 2020). Além disso, um estudo populacional revelou uma associação inversa entre a espermidina sérica e o índice triglicérido-glicose (TyG), bem como o risco de resistência à insulina (Zhang *et al.*, 2022). Esses efeitos benéficos sugerem uma ligação potencial entre a ação da espermidina e os mecanismos celulares associados ao estresse do retículo endoplasmático.

2.3.4 Espermidina e o Estresse do Retículo Endoplasmático

A relação entre a espermidina e o estresse do retículo endoplasmático (ERE) é sustentada por estudos que demonstram sua capacidade de reduzir o acúmulo de proteínas mal dobradas e promover a homeostase proteica. Baek *et al.* observaram que a espermidina atenuou a fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos, induzindo autofagia e inibindo a morte celular provocada pelo ERE (Baek *et al.*, 2020). Em outro estudo, a espermidina mostrou-se eficaz como estratégia de pré-tratamento para atenuar a lesão cardíaca associada ao estresse do RE em ratos, com o efeito cardioprotetor ocorrendo por meio da inibição da produção de espécies reativas de oxigênio e da regulação negativa da via PERK-eIF2 α (Wei *et al.*, 2016).

Além disso, pesquisas indicaram que a espermidina pode prevenir a neurotoxicidade induzida por glicose elevada e o ERE através da regulação positiva do fator de diferenciação de crescimento 11 (GDF11) (Liao *et al.*, 2022). Pichiah *et al.* sugerem que a espermidina pode

induzir autofagia em células β pancreáticas, reduzindo a carga de estresse causada pela resposta à proteína não dobrada (RPD). A indução da autofagia pode ser interpretada como um sinal indireto de suspensão da síntese proteica, o que permite a restauração do ERE exacerbado pela RPD. Isso proporcionaria tempo suficiente para a recuperação das células β , diminuindo a apoptose induzida por estresse nessas células. Dessa forma, a espermidina se apresenta como candidata promissora para preservação da massa de células β , frequentemente reduzida pela apoptose no DM2 (Pichiah *et al.*, 2011).

Neste contexto, o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma condição metabólica complexa e multifatorial que representa um crescente desafio de saúde pública em todo o mundo, devido ao aumento da prevalência e às complicações associadas. Intervenções terapêuticas atuais nem sempre são eficazes ou sustentáveis a longo prazo, devido aos efeitos colaterais e à variabilidade de resposta dos pacientes. Diante disso, é fundamental explorar novas abordagens que possam atuar sobre os mecanismos patogênicos subjacentes, como o estresse do retículo endoplasmático (RE), um fator crítico na disfunção das células β pancreáticas e na resistência à insulina. A espermidina, uma poliamina natural, tem emergido como uma molécula promissora devido às suas propriedades antioxidantes e de indução da autofagia, que podem mitigar o estresse do RE e melhorar o controle glicêmico. Este estudo, portanto, justifica-se pela necessidade de se investigar os efeitos da espermidina como uma potencial terapia inovadora para o DM2, ampliando o entendimento sobre seus mecanismos de ação e contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar biodisponibilidade oral e toxicidade da espermidina (ESP) e seus efeitos sobre camundongos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) induzidos por dieta rica em sacarose (DRS).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a farmacologia e toxicologia *in sílico* da ESP.
- Avaliar o efeito do tratamento oral com ESP sobre o metabolismo glicolipídico de camundongos diabéticos.
- Investigar as ações moleculares da ESP sobre marcadores do estresse do retículo endoplasmático no fígado dos animais.

4 RESULTADOS

4.1 Capítulo I – Avaliação Farmacológica e Toxicológica da Espermidina: uma abordagem *in silico*

4.1.1 Introdução

As poliaminas, como putrescina, espermidina e espermina, desempenham papéis multifuncionais essenciais para quase todos os organismos vivos. Elas são vitais para o crescimento celular e processos biológicos fundamentais, incluindo o desenvolvimento embrionário, a diferenciação celular e a proliferação. Essas moléculas, classificadas como aminas alifáticas, possuem carga positiva em pH fisiológico, e sua homeostase é rigidamente regulada para manter o funcionamento normal das células (Sari et al., 2021).

A espermidina (ESP) é a principal molécula da família das poliaminas e possui um baixo peso molecular. Ela é produzida naturalmente no corpo humano e pode ser sintetizada tanto nas células quanto por microrganismos presentes no intestino do hospedeiro. A alimentação também contribui significativamente como fonte dessa substância. Ela é crucial para diversas funções celulares, como o crescimento e a diferenciação celular, desempenhando um papel fundamental em processos de replicação do DNA, síntese de proteínas e estabilização de lipídios (Huang, J. *et al.*, 2020).

Pesquisas têm mostrado que a ESP protege a função cardiovascular e prolonga a longevidade em estudos realizados em animais (Madeo et al., 2018). Os mecanismos de cardioproteção mediados por ela envolvem a ativação da autofagia, a regulação da respiração mitocondrial e a melhoria da função mecânica e elástica dos cardiomiócitos (Ridler, 2017). Além disso, os mecanismos pelos quais ela promove a longevidade estão relacionados à indução da autofagia, à supressa da inflamação crônica e à inibição de apoptose indesejada (Minois, 2014). Singh et al. (2017) também demonstram que tanto a espermidina quanto a espermina funcionam como chaperonas químicas, auxiliando na manutenção da homeostase celular (Singh *et al.*, 2017). Outros estudos também indicam que a ESP pode exercer um papel neuroprotetor (Sharma et al., 2018; Yang et al., 2017).

Apesar dos avanços significativos na compreensão dos benefícios da espermidina, ainda existem lacunas importantes na literatura, especialmente no que diz respeito aos seus parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos. Além disso, há uma carência de informações detalhadas sobre os alvos moleculares e seus mecanismos de ação em diferentes

contextos biológicos. Dessa forma, este trabalho visa preencher essas lacunas por meio de uma avaliação *in silico* dos parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos da espermidina. O objetivo é fornecer uma visão abrangente e inicial que possa orientar futuras investigações, possibilitando um entendimento mais aprofundado dos potenciais usos terapêuticos dessa poliamina.

4.1.2 Material e Métodos

4.1.2.1 Análise das propriedades físico-químicas e de semelhança com medicamentos

Para análise e cálculo das características físico-químicas, bem como a previsão de parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, propriedades farmacocinéticas, e similaridade a drogas foi utilizado o software online SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Suíça, <http://www.swissadme.ch/>) (Daina, A *et al.*, 2017). Essa avaliação fornece uma predição qualitativa com base nos parâmetros quantitativos farmacocinéticos para a potencial drogabilidade da espermidina em um contexto de administração oral, usando a regra de Lipinski. Esta regra estabelece que pelo menos três de quatro requisitos devam ser apresentados para que o composto possua uma boa biodisponibilidade: possuir miLogP menor ou igual a 5,00; massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol; área de superfície polar (TPSA) menor ou igual a 140 Å² ou a soma do número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio menor que 12; máximo de 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nALH), que é expresso pela soma de átomos de N e O; máximo de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH), expresso pela soma de OH e NH na molécula.

4.1.2.2 Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos

O comportamento farmacocinético da ESP também foi avaliado usando software SwissADME. Os vários parâmetros considerados incluíram absorção intestinal, relação com a barreira hematoencefálica (BHE), metabolismo relacionado ao substrato da glicoproteína P, e ação sobre o citocromo P450.

4.1.2.3 Avaliação dos parâmetros toxicológicos

Para avaliação dos alvos de toxicidade foi utilizado o PRO TOX-II (Banerjee *et al.*, 2018) (<https://tox-new.charite.de/protox-II/>), que determina as reações adversas a medicamentos e efeitos toxicológicos. As doses são consideradas como valores de DL50 em mg/kg de peso corporal. O DL50 é a dose letal mediana, significando a dose na qual 50% dos sujeitos de teste morrem após a exposição a um composto. A previsão aguda dos alvos pode ser prevista em alvos mais específicos, avaliando a hepatotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade dos compostos. Possibilitando o valor da dose letal (DL50), órgãos, tipo de predição classificados como ativos e inativos e probabilidade do alvo. Assim, prevendo uma possível ligação a alvos de toxicidade usando uma coleção de farmacóforos baseados em ligantes de proteínas.

4.1.2.4 Predição computacional de espectros de atividade biológica e toxicidade

O programa de computador PASS (Lagunin *et al.*, 2011) foi utilizado para determinar as possíveis atividades biológicas e toxicidade da ESP. A estimativa foi baseada nas relações estrutura-atividade a partir de um amplo banco de dados específicos conhecidos sobre toxicidade de outros compostos de diversas origens. A análise foi realizada através da análise de multinível de vizinhança de átomos (MNA), com previsão simultânea de até 3678 tipos de atividades biológicas e precisão média de cerca de 95% (validação cruzada *leave-one-out*) com base na fórmula estrutural do composto. Os resultados são expressos como Pa (maior probabilidade de atividade) e Pi (menor probabilidade de atividade), segundo o estabelecido na literatura, para este trabalho utilizou-se atividades com Pa acima de 0,7 (70%).

4.1.2.5 Previsão de perfis de interação com alvos farmacológicos

O software SWISS TARGET PREDICTION (ferramenta online, Swiss Institute of Bioinformatics) foi utilizado para estimar o salvos macromoleculares mais prováveis para a ESP (Daina, A *et al.*, 2017). Para isso, a previsão foi baseada em uma combinação de similaridade 2D e 3D com uma biblioteca de 370.000 ativos conhecidos.

4.1.3 Resultados

4.1.3.1 Análise Físico-químicas

A análise físico-química da ESP envolveu a determinação das seguintes propriedades: peso molecular, LogP (coeficiente de partição), número de ligações rotativas, número de ligações receptoras de hidrogênio, número de ligações doadoras de hidrogênio e área de superfície polar. Os dados correspondentes estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da espermidina por análise *in silico*.

Propriedade	Resultado
Peso Molecular	145,25
Coeficiente de Partição	1,85
Ligações Rotativas	7
Número de receptores de hidrogênio	3
Número de doadores de hidrogênio	3
Área de superfície polar topológico	64.07 Å ²

4.1.3.2 Estimativa da biodisponibilidade oral da espermidina

Posteriormente, os parâmetros físico-químicos avaliados na fase inicial foram utilizados para investigar o comportamento da espermidina após administração oral, seguindo as diretrizes estabelecidas por Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Mueghe. A espermidina não apresentou violações das diretrizes recomendadas por Lipinski, Veber e Egan. No entanto, em relação a Ghose e Muegge, observaram-se violações no parâmetro de peso molecular. Esses resultados foram compilados na tabela 2.

Tabela 2. Estimativa da biodisponibilidade oral da espermidina

Parâmetro	Resultado
Lipinski	Sim, 0 violações
Ghose	Não. 1 violação: peso molecular < 160
Veber	Sim
Egan	Sim
Muegge	Não. 1 violação: peso molecular < 200
Score de biodisponibilidade	0,55

4.1.3.3 Comportamento farmacocinético

Quanto ao comportamento farmacocinético, a ESP demonstra alta absorção gastrointestinal, não atravessa a barreira hematoencefálica, não é um substrato da glicoproteína P e não exerce inibição sobre nenhuma das principais enzimas do citocromo P450. Estes resultados foram resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos da espermidina

Parâmetro	Resultado
Absorção pelo trato gastrointestinal	Alta
Penetração pela barreira hematoencefática	Não
Substrato de glicoproteína P	Não
Inibição do Citocromo P4501A2	Não
Inibição do Citocromo P45012C19	Não
Inibição do Citocromo P4502D6	Não
Inibição do Citocromo P4503A4	Não

4.1.3.4 Análise Toxicológica

Após a análise do comportamento farmacocinético, foi realizada uma avaliação da toxicologia da ESP. Verificou-se que a dose letal foi de 820 mg/kg, classificando-a na classe 4 de toxicidade. Em relação à toxicidade em alvos específicos, a espermidina demonstrou ser inativa em termos de hepatotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade e mutagenicidade, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Predição de toxicidade da espermidina.

Parâmetro	Resultado
DL50	820 mg/kg
Classe	4
Hepatotoxicidade	Inativa (93%)
Carcinogenicidade	Inativa (67%)
Imunotoxicidade	Inativa (87%)
Mutagenicidade	Inativa (75%)

4.1.3.5 Predição dos espectros de atividade biológica

Após a análise dos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos, optou-se por examinar os espectros de atividade biológica da ESP, isto é, prever como a espermidina pode interagir com alvos biológicos específicos. Foram considerados apenas os resultados com uma probabilidade de atividade superior a 70%. Os resultados estão resumidos na Tabela 5 e foram expressos como Pa (maior probabilidade de atividade) e Pi (menor probabilidade de atividade), segundo o estabelecido na literatura, para este trabalho utilizou-se atividades com Pa acima de 0,7 (70%).

Tabela 5. Previsão in silico dos espectros de atividade biológica da espermidina. “Pa” refere-se a maior potencial de atividade; “Pi” refere-se ao menor potencial de atividade.

Atividade	Pa	Pi
Antagonista do transportador de aminoácidos-poliamina-organocação (APC)	0,966	0,000
Tratamento de distúrbios fóbicos	0,929	0,004
Tratamento da mucosite	0,927	0,005
Inibidor da dimetilargininase	0,888	0,003
Inibidor da glicose oxidase	0,886	0,005
Agonista do receptor de imidazolina	0,883	0,002
5 Estimulante de liberação de hidroxitriptamina	0,886	0,006
Inibidor de venombina AB	0,873	0,003
Inibidor da arginina 2-monooxygenase	0,864	0,004
Inibidor de omptina	0,862	0,004
Inibidor da enzima conversora da pró-opiomelanocortina	0,865	0,007
Inibidor de fibrolase	0,859	0,002
Espasmolítico urinário	0,848	0,004
Limpador de oxigênio	0,844	0,002
Inibidor do fator C de coagulação de Limulus	0,844	0,004
Inibidor da superóxido dismutase	0,844	0,005
Inibidor do fator B de coagulação de Limulus	0,835	0,004
Inibidor da poliamina oxidase	0,826	0,001
Inibidor de pitrilsina	0,829	0,005
Inibidor da metilumbelliferil-acetato desacetilase	0,824	0,004
Inibidor da acetilespermidina desacetilase	0,820	0,001
Inibidor da serina endopeptidase IgA específica	0,824	0,005
Inibidor da acilcarnitina hidrolase	0,825	0,011
Inibidor da ornitinaesterase da fusarinina-C	0,819	0,005
Inibidor da N-benziloxycarbonilglicina hidrolase	0,817	0,005
Inibidor da proteína-dissulfeto redutase (glutathione)	0,820	0,008
Inibidor da proteína-glutamato metilesterase	0,822	0,011
Antagonista da espermina	0,797	0,000
Inibidor de enteropeptidase	0,794	0,004
Agonista peptídico	0,793	0,005
Inibidor da amidase conjugada com micotiol-S	0,787	0,003
Agonista do fator de crescimento de fibroblastos	0,777	0,004
Inibidor da acetilornitina desacetilase	0,776	0,003
Inibidor de sacaropsina	0,794	0,022
Inibidor de acrocylindropepsin	0,794	0,022
Inibidor de quimosina	0,794	0,022
Antagonista da integridade da membrana	0,778	0,008
Inibidor de catepsina T	0,773	0,003
Inibidor de pseudolisina	0,774	0,009
Inibidor da arilsulfato sulfotransferase	0,770	0,009
Inibidor da hidrogênio desidrogenase	0,763	0,005
Radioprotetor	0,763	0,007
Agonista do fator estimulador de colônias de macrófagos	0,761	0,007
Inibidor de Dcp da peptidil-dipeptidase	0,765	0,012
Protetor mucomembranoso	0,772	0,027
Inibidor da lisina 2,3-aminomutase	0,755	0,010
Inibidor da dipeptidase E	0,747	0,003

Inibidor da N-acetiltransferase diamina	0,745	0,002
Inibidor da fosfatidilglicerofosfatase	0,745	0,004
Inibidor da testosterona 17beta-desidrogenase (NADP+)	0,768	0,034
Agonista da integridade da membrana	0,775	0,041
Citoprotetor	0,728	0,004
Inibidor de Fragilysin	0,731	0,014
Inibidor da carboxipeptidase D	0,719	0,003
Ativador do canal de cálcio (sensível à voltagem)	0,719	0,004
Substrato do CYP2J	0,747	0,035
Inibidor da redutase do enxofre	0,715	0,004
Agonista do fator de crescimento de fibroblastos 1	0,714	0,004
Antiseborréico	0,740	0,030
Inibidor da N-succiniltransferase 2,3,4,5-tetrahidropiridina-2,6-dicarboxilato	0,711	0,003
Agonista do receptor C GABA	0,711	0,003
Inibidor da aspulvinona dimetilaltransferase	0,750	0,048
Inibidor da NADPH peroxidase	0,724	0,023
Inibidor da glicosilfosfatidilinositol fosfolipase D	0,726	0,029
Inibidor da carboxipeptidase Taq	0,710	0,018
Substrato do CYP2J2	0,717	0,029
Inibidor do fator D do complemento	0,705	0,018
Inibidor da esfinganina quinase	0,706	0,023
Antagonista do receptor alfa6beta3beta4alpha5 nicotínico	0,708	0,032
Inibidor de açúcar-fosfatase	0,706	0,032
Inibidor da ubiquinol-citocromo-c redutase	0,704	0,067

4.1.3.6 Previsão de perfis de interação com alvos farmacológicos

Após uma análise detalhada das potenciais atividades biológicas da ESP, foi decidido aprofundar a investigação sobre os alvos farmacológicos nos quais ela poderia agir. Observou-se que a ESP exibe uma gama de interações com diversos alvos biológicos. Em particular, ela demonstrou afinidade com várias isoformas de anidrase carbônica, enzimas essenciais para a regulação do equilíbrio ácido-base no organismo. Além disso, foram identificadas interações com a caspase-2, uma proteína associada à apoptose e à regulação do ciclo celular. Adicionalmente, a espermidina também demonstrou interação com o receptor neuronal de acetilcolina $\alpha 4\beta 2$, um componente chave do sistema colinérgico.

Tabela 6. Previsão dos alvos moleculares da espermidina in silico

Alvo	Classe do Alvo	Probabilidade
Anidrase carbônica II	Liase	100%
Anidrase carbônica VII	Liase	100%
Anidrase carbônica I	Liase	100%
Anidrase carbônica VI	Liase	100%
Anidrase carbônica XIV	Liase	100%
Anidrase carbônica IX	Liase	100%

Anidrase carbônica IV	Liase	100%
Anidrase carbônica VB	Liase	100%
Anidrase carbônica VA	Liase	100%
Caspase-2	Protease	100%
Anidrase carbônica III	Liase	2,38%
Anidrase carbônica XIII	Liase	2,38%
Receptor neuronal de acetilcolina $\alpha 4\beta 2$	Canal iônico dependente de ligante	2,38%

4.1.4 Discussão

A análise físico-química da ESP é uma etapa fundamental no processo de compreender suas propriedades e potencialidades terapêuticas. As propriedades avaliadas, como peso molecular, LogP, número de ligações rotativas, número de ligações receptoras e doadoras de hidrogênio, e área de superfície fornecem informações valiosas sobre a natureza da molécula e seu comportamento em sistemas biológicos. O peso molecular é um parâmetro de grande importância, uma vez que compostos grandes possuem dificuldade de difusão através das membranas da bicamada lipídica, bem como reduzem a solubilidade da molécula (Agoni *et al.*, 2020). A lipofilicidade, medida por log de P, reflete a afinidade de uma molécula por um ambiente aquoso ou lipofílico e pode ser usada para prever a capacidade das moléculas de atravessar as membranas celulares e se ligar a proteínas, que são principalmente hidrofóbicas por natureza (Lobo, 2020).

Um grande número de grupos doadores de ligações de hidrogênio em um composto pode reduzir a capacidade de uma molécula de permear a bicamada lipídica da membrana plasmática. Compostos que possuem um grande número de doadores de ligações hidrogênio tenderão a se particionar em um solvente fortemente formador de ligações de hidrogênio (como a água) em vez de no ambiente lipofílico presente em uma membrana celular. Pelo mesmo motivo que os doadores de ligações de hidrogênio reduzem a permeabilidade de compostos em ambientes lipofílicos, os aceitadores de ligações de hidrogênio afetam a permeabilidade ao interagir favoravelmente com solventes fortemente formadores de ligações de hidrogênio, como a água (Lipinski *et al.*, 2012).

A área de superfície polar (PSA) ou PSA topográfico (TPSA) é a soma da superfície da molécula de seus átomos polares (oxigênio, nitrogênio e seus átomos de hidrogênio ligados). O PSA é um parâmetro que se correlaciona com o transporte passivo de moléculas através de membranas, como absorção intestinal e penetração hematoencefálica e, portanto, é usado para a otimização da capacidade de penetração de um fármaco nas células. Moléculas com PSA >

140 A2 apresentam baixa permeabilidade através das membranas celulares, enquanto moléculas com PSA < 90 A2 são prováveis penetradoras da barreira hematoencefálica (Odi *et al.*, 2020).

Após a fase inicial de avaliação dos parâmetros físico-químicos da espermidina, esses dados foram utilizados para investigar seu comportamento após administração oral, seguindo as diretrizes estabelecidas por modelos renomados na área de desenvolvimento de fármacos, como Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge (Egan *et al.*, 2000; Ghose *et al.*, 1999; Lipinski, 2001; Muegge *et al.*, 2001; Veber *et al.*, 2002). Esses modelos são amplamente reconhecidos e empregados para prever a probabilidade de sucesso de um composto como um candidato a medicamento. Os resultados obtidos revelaram que a ESP não violou as diretrizes recomendadas por Lipinski, Veber e Egan. Isso sugere que a ESP apresenta características favoráveis em relação à absorção, permeabilidade e solubilidade, fatores determinantes para a biodisponibilidade oral e eficácia terapêutica.

O comportamento farmacocinético da ESP revela uma série de características que são fundamentais para sua utilização terapêutica. Primeiramente, ela demonstra uma absorção gastrointestinal eficiente, o que significa que é prontamente absorvida quando administrada por via oral. Isso é crucial para que seja eficaz quando administrado dessa forma, facilitando sua utilização em formulações farmacêuticas convencionais (Macheras; Chrysafidis, 2020). Ao comparar esses resultados *in silico* com dados *in vivo* em humanos, um estudo conduzido por Senekowitsh *et al.* (2023) revelou que a suplementação oral de espermidina, na dose de 15 mg/dia por 4 dias, elevou significativamente as concentrações plasmáticas de espermina, sem alterar os níveis de espermidina. Isso sugere que a espermidina administrada por via oral é convertida em espermina antes de atingir a circulação sistêmica, indicando que os efeitos clínicos da suplementação de espermidina podem ser atribuídos, pelo menos em parte, ao seu metabólito, a espermina, e não diretamente à própria espermidina (Senekowitsch *et al.*, 2023).

Além disso, é importante notar que ela não atravessa a barreira hematoencefálica. Esse é um mecanismo de proteção essencial que regula a entrada de substâncias do sangue para o cérebro. O fato dela não cruzar essa barreira sugere que seus efeitos são predominantemente periféricos, o que pode ser vantajoso para evitar efeitos colaterais no sistema nervoso central (Correia *et al.*, 2022).

Outro aspecto relevante da ESP é o fato de não ser substrato da glicoproteína P. Esta é uma proteína de transporte que desempenha um papel importante na eliminação de substância do corpo. Isso sugere que seu perfil de eliminação pode ser menos sujeito a resistência mediada por essa proteína, o que é importante para garantir sua eficácia terapêutica a longo prazo (Elmeliegy *et al.*, 2020).

Além disso, a espermidina não exerce inibição sobre nenhuma das principais enzimas do citocromo P450. Essas enzimas desempenham um papel crucial no metabolismo de muitos compostos químicos no organismo, e o fato de a espermidina não as inibir é importante para evitar interações medicamentosas indesejadas e garantir sua segurança durante o uso concomitante com outros medicamentos (Daina, Antoine *et al.*, 2017). O citocromo P450 humano (CYP) refere-se a uma superfamília de hemoproteínas com 57 isoformas encontradas principalmente em células hepáticas. Essas enzimas são responsáveis pelo metabolismo de compostos endógenos e exógenos, incluindo drogas e toxinas. Entre as várias isoformas do CYP450, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 e 3A4 são os subtipos mais comuns que desempenham papéis essenciais em quase 90% das reações metabólicas oxidativas. A inibição das isoformas do CYP, portanto, pode causar a falha indutiva ou inibitória no metabolismo de drogas (por exemplo, interações droga-droga ou alimento-medicamento) e, em seguida, resultar em efeitos colaterais graves (Nguyen-Vo *et al.*, 2021).

Após a análise do comportamento farmacocinético, é crucial realizar uma avaliação completa de sua toxicologia para determinar sua segurança e viabilidade como agente terapêutico. Os resultados dessa avaliação fornecem informações valiosas sobre os potenciais efeitos adversos da substância. Uma descoberta importante foi a determinação da dose letal (DL50) da espermidina, que foi estabelecida em 820 mg/kg. Esta dose letal classifica a espermidina na classe 4 de toxicidade, indicando que é considerada uma substância nociva se ingerida em quantidade significativas. Esse dado é crucial para estabelecer diretrizes de dosagem seguras e para alertar sobre os possíveis perigos associados à ingestão excessiva da substância. Além disso, a avaliação da toxicidade em alvos específicos é fundamental para entender os potenciais riscos para órgãos e sistemas específicos do corpo (Banerjee *et al.*, 2018).

Os resultados indicaram que a ESP demonstrou ser inativa em termos de hepatotoxicidade (toxicidade hepática), carcinogenicidade (capacidade de causar câncer), imunotoxicidade (toxicidade ao sistema imunológico) e mutagenicidade (capacidade de causar mutações genéticas). Til *et al.* (1997) propôs um teste de toxicidade agudo e subagudo em diversas aminos biogênicas. No teste agudo utilizando dose únicas, a espermidina possuiu uma toxicidade oral aguda relativamente alta, com uma dose letal mediana de 600 mg/kg de peso corporal. No teste de toxicidade subaguda, com administração contínua na dieta por 5 a 6 semanas, as doses de espermidina nas dietas variaram de 200 ppm a 10.000 ppm. No grupo que recebeu 10.000 ppm, observou-se uma redução significativa no peso corporal e na ingestão de alimentar, tanto em machos quanto em fêmeas. Efeitos bioquímicos no sangue foram detectados com a dose mais alta, incluindo aumentos nas atividades das enzimas hepáticas, como a alanina aminotransferase

(ALT) e aspartato aminotransferase (AST), além de diminuição nos níveis de cálcio e potássio no plasma. Houve também uma redução nos níveis de proteínas plasmáticas nas fêmeas e uma diminuição nos níveis de creatinina, cálcio e fosfato inorgânico no plasma. Observou-se um aumento nos pesos relativos do cérebro, testículo e rins em machos tratados com altas doses de espermidina, junto com uma diminuição no peso relativo do fígado, sugerindo possíveis danos hepáticos. A diferença nas doses letais pode ser explicada pelas limitações e variações entre modelos *in sílico* e *in vivo*. Embora os modelos *in sílico* ofereçam estimativas rápidas e amplamente aplicáveis, eles não capturam todas as complexidades da fisiologia animal, como metabolismo e interações biológicas que podem intensificar a toxicidade em experimentos *in vivo*. Além disso, fatores como biodisponibilidade, metabolismo e excreção em animais vivos podem aumentar a toxicidade observada. Em relação a toxicidade em alvos específicos, é possível ressaltar que modelos *in sílico* utilizam bancos de dados de substâncias conhecidas para prever efeitos tóxicos em alvos específicos, enquanto estudos *in vivo* consideram reações fisiológicas mais abrangentes. As alterações hepáticas observadas no estudo *in vivo* podem ser resultado de um acúmulo da substância ou uma resposta ao estresse metabólico em altas doses. No entanto, essas respostas podem não ser suficientemente severas para serem consideradas hepatotoxicidade em modelos *in sílico*, que geralmente preveem toxicidade com base em parâmetros mais críticos, como lesão hepática direta ou morte celular. Além disso, os efeitos tóxicos observados em estudos de longo prazo podem ser mais intensificados devido à exposição crônica, enquanto no estudo *in sílico* há a captação de efeitos agudos e subagudos em uma exposição limitada (Til *et al.*, 1997).

A citotoxicidade da ESP também foi avaliada utilizando num modelo de células do intestino delgado. Quando a concentração foi inferior a 1,5 g/L no caldo de cultura, a morfologia e o número de células intestinais permaneceram inalterados. Acima de 1,5 g/L, o número de células diminuiu consideravelmente as células se deformaram (Del Rio *et al.*, 2018). Ademais, a ESP é encontrada naturalmente em diversos organismos, desde bactérias até o ser-humano, indicando que é uma substância biologicamente compatível e bem tolerada, sendo encontrada em doses altas e variáveis na dieta humana (Madeo *et al.*, 2018). Alimentos como gérmen do trigo, feijão, cogumelos, grãos integrais e vegetais possuem teores relativamente altos dela (Madeo *et al.*, 2020b; Nishimura *et al.*, 2006). Em relação a fontes animais, pode-se observar que o teor de ESP de frutos do mar e mariscos é relativamente alto. Além disso, o fígado animal também contém um alto nível de espermidina, com teor variando entre 10 a 360 mg/kg (Krausová *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2022). Essas descobertas são encorajadoras pois propõem que essa substância possui um perfil de toxicidade favorável.

O estudo de Keohane et al (2024) indicou que a suplementação com espermidina altamente purificada (hpSPD) a 40 mg/dia por até 28 dias em homens mais velhos foi segura e bem tolerada. Não houve mudanças significativas nos parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos ou de lipídios em comparação ao grupo placebo. Além disso, não foram observadas mudanças substanciais nas concentrações de poliaminas no soro e na urina, sugerindo um controle homeostático eficaz do metabolismo da espermidina nessa dosagem. O estudo conclui que a suplementação é segura e não afeta significativamente o metabolismo das poliaminas (Keohane *et al.*, 2024).

Após a análise dos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos da espermidina, o próximo passo foi examinar os espectros de atividade biológica, ou seja, prever como a ESP pode interagir com alvos biológicos específicos. Esse tipo de análise é crucial para entender o potencial terapêutico da substância, identificando seus possíveis efeitos farmacológicos e mecanismos de ação. Durante esse processo, foram considerados apenas os resultados com uma probabilidade de atividade superior a 70%. Essa seleção criteriosa visa focar nos resultados mais promissores e confiáveis, aumentando a relevância e a utilidade das descobertas. Ao examinar os espectros de atividade biológica, buscou-se identificar possíveis alvos moleculares com as quais a espermidina pode interagir. Isso inclui enzimas, receptores e outras proteínas celulares envolvidas em processos biológicos relevantes para o desenvolvimento de terapias. Essa abordagem permite pressupor o perfil farmacológico da ESP, fornecendo descobertas importantes sobre seus possíveis efeitos terapêuticos e potenciais aplicações clínicas. O grande espectro de atividades biológicas encontrado na análise do PASS Online é confirmado com dados da literatura. Essa análise demonstrou que a ESP possui uma gama de efeitos biológicos, atuando em doenças cardiovasculares e musculares (Eisenberg *et al.*, 2016; Michiels *et al.*, 2016), em síndrome metabólica (Fernández *et al.*, 2017), e neuroproteção (Deng *et al.*, 2009). Ao considerar os resultados com uma probabilidade de atividade significativa, é possível direcionar futuras investigações, otimizando o uso dessa substância como uma ferramenta terapêutica promissora.

Após uma análise das possíveis atividades biológicas da ESP, foi decidido investigar mais a fundo os alvos farmacológicos nos quais ela poderia atuar. Observou-se que ela pode possuir uma quantidade razoável de alvos farmacológicos que incluem liases, proteases e canais iônicos. Em particular, ela demonstrou afinidade com a caspase-2, uma proteína envolvida na apoptose e na regulação do ciclo celular e importante no estresse do retículo endoplasmático (RE). A cronicidade desse estresse promove a transição da resposta à proteína mal enovelada de um padrão adaptativo para um padrão pró-apoptótico. Isso acontece devido ao mecanismo

chamado *regulated IRE-1-dependent decay* (RIDD). A maior atividade da RIDD pode conduzir a morte celular através da redução de microRNAs que normalmente reprimem alvos pró-apoptóticos como *thioredoxin-interacting protein* (TXNIP) e caspase-2 (Upton *et al.*, 2012). O fato da análise *in silico* da espermidina propor a caspase-2 como um possível alvo farmacológico da espermidina permite ter uma percepção de um possível mecanismo de ação da ESP sobre o estresse do RE.

4.1.5 Conclusão

Com base na análise físico-química, farmacocinética e toxicológica da espermidina, o estudo destacou seu potencial terapêutico promissor, especialmente devido às suas propriedades favoráveis de biodisponibilidade e segurança. A espermidina mostrou alta absorção gastrointestinal, ausência de inibição de enzimas essenciais do citocromo P450 e baixo risco de interações medicamentosas, características que são essenciais para sua utilização terapêutica. Além disso, a análise toxicológica revelou que a espermidina possui um perfil de toxicidade relativamente baixo, com inatividade em termos de hepatotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade e mutagenicidade.

Os espectros de atividade biológica preditos indicam que a espermidina pode interagir com diversos alvos biológicos, incluindo enzimas e receptores envolvidos em processos cruciais, como apoptose e resposta ao estresse do retículo endoplasmático. Portanto, esses resultados enfatizam a relevância da espermidina como um composto multifuncional com aplicações terapêuticas potenciais, justificando investigações futuras para elucidar seus mecanismos de ação em diferentes contextos biológicos e explorar seu uso em intervenções clínicas.

4.2 Capítulo II – Espermidina melhora o perfil glicolipídico de camundongos fêmeas diabéticos: o papel do estresse do retículo endoplasmático hepático

4.2.1 Introdução

O consumo de açúcar em países industrializados aumentou exponencialmente nos últimos 200 anos, enquanto as preocupações com seus efeitos prejudiciais surgiram apenas nas últimas quatro décadas (Bray, 2010; Bray *et al.*, 2004; Yudkin, 1972; 1983). A sacarose é o principal componente do consumo de açúcar no mundo, chegando a representar até 25% da ingestão total de energia em diversos países (Bray, 2010; Gibson *et al.*, 2013). Sob ação da sacarase intestinal, a sacarose é rapidamente hidrolisada em glicose e frutose, seus dois monossacarídeos constituintes (Tappy *et al.*, 2010). No entanto, uma vez na corrente sanguínea, esses açúcares seguem caminhos distintos: a glicose estimula a liberação de insulina para sua absorção pelos tecidos sensíveis à insulina, enquanto a frutose é quase totalmente captada pelo fígado, onde é convertida em trioses e posteriormente utilizada na síntese de lipídeos (Rippe; Angelopoulos, 2013).

Uma revisão em adultos concluiu que há evidências consistentes, provenientes de estudos de coorte prospectivos, de que o consumo de bebidas açucaradas está associado a um risco aumentado de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (Mis *et al.*, 2017). Duas meta-análises de estudos prospectivos demonstraram uma associação entre o consumo de bebidas açucaradas e a incidência do DM2 (Greenwood *et al.*, 2014; Malik *et al.*, 2010). Outra meta-análise, que incluiu 10 grandes estudos prospectivos, mostrou uma redução significativa do risco relativo de DM2 em indivíduos que aderem a um padrão alimentar saudável, incluindo a redução do consumo de bebidas com açúcar (Esposito *et al.*, 2010).

O DM2 é uma doença metabólica crônica e complexa, caracterizada pela presença persistente de hiperglicemia, resultante de uma menor sensibilidade dos tecidos à ação da insulina ou resistência insulínica (RI) (Xu *et al.*, 2022). Apesar da elevação da glicemia ser um parâmetro determinante para o diagnóstico do DM2, estudo anterior do nosso grupo de pesquisa verificou que a hipertrigliceridemia pode ser um marcador mais precoce do quadro de resistência insulínica (RI) inicial (França *et al.*, 2020). Neste contexto, o fígado tem um papel determinante tanto para o controle dos triglicerídeos como da glicemia. Ademais, a doença gordurosa hepática não-alcoólica (DHGNA), uma condição intrinsecamente associada ao DM2, contribui diretamente tanto para a piora dessa patologia como para o risco cardiovascular (Tanase *et al.*, 2020).

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela responsável pela produção, tráfego, processamento e secreção de proteínas, armazenamento de cálcio e produção de lipídios. O estresse do retículo endoplasmático (ERE) é um elemento molecular central ligado à disfunção hepática associada ao DM2, uma vez que no fígado esse processo estimula a síntese de novo de triglicerídeos e a maior produção de glicose, contribuindo, assim, tanto para manutenção da hiperglicemia como para o maior acúmulo de gordura hepática (Flessa *et al.*, 2022).

A espermidina (ESP) é uma poliamina natural existente em todas as células vivas. É conhecida por desempenhar um papel importante nas funções celulares (ex: autofagia, proteção contra o estresse oxidativo). Recentemente, estudos relataram o efeito das alterações no *pool* de ESP em vias metabólicas. Por exemplo, foi demonstrado que a ativação da espermidina/espermina N-1 acetil-transferase (SSAT), a enzima limitante da taxa no catabolismo da poliamina, melhorou o metabolismo da glicose e dos lipídios. (Choksomngam *et al.*, 2021). Ademais, estudo *in vitro* demonstrou que a indução de SSAT e o catabolismo elevado da poliamina aumenta a fosforilação do fator de iniciação da tradução eucariótica 2 α (eIF2 α) e aumenta a expressão da imunoglobulina de ligação BiP (GRP78) e de outras proteínas envolvidas no ERE como CHOP e GADD153 (Zahedi *et al.*, 2017). Nesse contexto, a ESP também demonstrou ação semelhante às chaperonas (Singh *et al.*, 2017), que são proteínas chave na promoção do correto enovelamento proteico e restabelecimento da homeostase no RE (Ajoalabady *et al.*, 2023).

Apesar de avanços significativos na compreensão dos mecanismos que contribuem para o DM2, ainda existe uma lacuna crítica na literatura quanto ao papel específico da ESP na modulação do ERE em modelos de diabetes. Dado que o ERE hepático é um fator central na disfunção da glico-lipídica, e considerando a crescente evidência de que a ESP pode influenciar positivamente diversas vias metabólicas, investigar essa relação é crucial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o DM2. Assim, o presente estudo visa preencher essa lacuna ao explorar como a ESP pode modular a homeostase do RE em camundongos com diabetes induzido por sacarose, oferecendo novos esclarecimentos sobre a possibilidade de utilizar essa poliamina natural como uma estratégia terapêutica inovadora no tratamento do DM2.

4.2.2 Material e Métodos

4.2.2.1 Animais e componentes nutricionais

Foram utilizados 21 camundongos fêmeas (*Mus musculus*, Swiss) com 21 dias de vida provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão e acomodados durante todo o período de experimentação no Biotério Setorial da Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS-UFMA) em gaiolas de polietileno forradas com xilana, em ambiente controlado (22 ± 2 °C; 60% de umidade, exaustão e ciclo claro/escuro de 12 horas), máximo de 7 animais/gaiolas e livre acesso à dieta, água e/ou solução de sacarose. Todos os protocolos experimentais propostos foram aprovados pelo parecer nº 23115.008036/2023-44 do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMA (Anexo A). Os animais receberam ração padrão para roedores (Nuvital®, Nuvilab, Brasil) composta por 55,4% de carboidratos totais (10% de sacarose), 21% de proteínas, 5,2% de lipídeos totais, totalizando 3,52 kcal/g e/ou mamadeiras contendo água filtrada ou solução de sacarose 30%.

O número amostral de 7 animais por grupo definido neste projeto foi determinado utilizando o programa gratuito de cálculo amostral G*Power 3.1 (Heinrich-Heine University Düsseldorf, Düsseldorf (NRW), Germany) (Faul *et al.*, 2007). Para isso, através de dados anteriores do grupo (Pinto *et al.*, 2016), foi calculado o tamanho do efeito de 0,72 no site *Social Science Statistics* (<https://www.socscistatistics.com/>). Esse valor foi inserido no G*Power juntamente com o poder do estudo de 80% e um nível de significância de 5%, obtendo-se um número amostral de 21 animais (7 por grupo).

4.2.2.2 Grupos e abordagem experimental

Aos 21 dias de vidas, os animais foram randomizados e distribuídos uniformemente de acordo com o peso em três grupos: grupo controle (CTR; n=7) que recebeu ração padrão para roedores e duas mamadeiras contendo água filtrada; grupo dieta rica em sacarose (DRS, n=7) que recebeu a ração padrão, uma mamadeira contendo água filtrada e outra mamadeira contendo solução de sacarose; e grupo dieta rica em sacarose/espermidina (DRS/ESP, n=7) que também recebeu uma mamadeira contendo água filtrada e outra mamadeira contendo solução de sacarose. A fim de evitar condicionamento, a posição das mamadeiras com solução de sacarose era periodicamente alterada nas gaiolas.

A partir da 12ª semana de acompanhamento, os animais DRS/ESP foram administrados (via oral, gavagem) com espermidina (ESP) (Sigma #S2626) na dose de 20 mg/kg e os animais DRS receberam o veículo (água, 0,1 ml/10g). O tratamento com ESP e a administração do veículo foi realizada por 8 semanas. A dose da ESP foi definida de acordo com estudo recente

utilizando animais alimentados com dieta rica em gordura e a ESP administrada em água de beber (Liao *et al.*, 2021). O desenho experimental está ilustrado na figura 1.

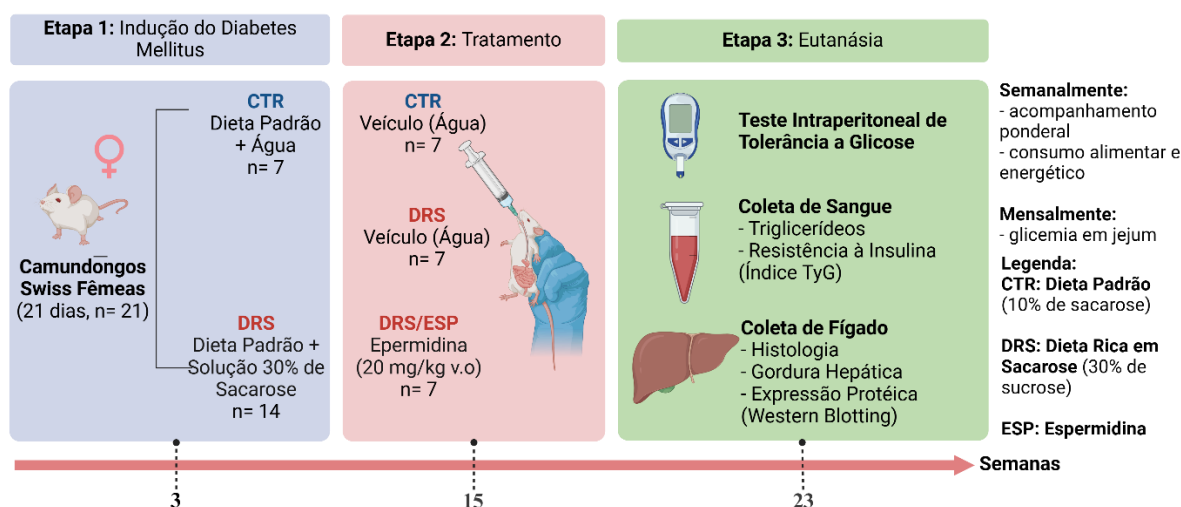


Figura 9. Desenho Experimental

4.2.2.3 Avaliação da Morfometria, do Consumo e da Homeostase Glicêmica

Durante todo o período de acompanhamento, os animais foram pesados três vezes por semana para avaliação do progresso ponderal. A ração sólida era fornecida aos animais no início da semana e trocada três vezes, registrando a quantidade inicial e final. O consumo energético foi calculado através da soma de calorias ingeridas através do consumo de ração e consumo de solução de sacarose. Mensalmente, os animais foram submetidos a jejum de 8 horas e alíquotas de sangue periférico foram coletadas a partir de punções da cauda para avaliação da glicemia em jejum por glicosímetro (Accu Check Active, Roche) através de sangue da ponta da cauda. Na última semana de tratamento, foi realizado o teste oral de tolerância a glicose (GTT, do inglês). Para o GTT, os animais ficaram em jejum diurno (8 h) para a glicose ser mensurada nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60 e 120 minutos após administração de *bolus* de glicose (dose 2 g/kg).

4.2.2.4 Análises da Bioquímica Sérica e da Resistência Insulínica

Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a uma restrição alimentar diurna de 8 a 10 horas e anestesiados (i.p) com uma solução anestésica de cetamina + xilazina nas doses de 100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente (Flecknell, 2015), para coleta de sangue. Após coagulação, o sangue foi centrifugado (3500 rpm, 10 min) para obtenção do soro, o qual foi utilizado para a determinação das concentrações triglicerídeos, colesterol total e ácidos graxos

livres por métodos espectrofotométricos utilizando *kits* laboratoriais. A resistência insulínica (RI) foi inferida pelos cálculos dos índices TyG ($TyG = \ln[\text{triglicerídeos em jejum (mg/dL)} \times \text{glicose em jejum (mg/dL)}]/2$) (Simental-Mendía *et al.*, 2008).

4.2.2.5 Coleta dos Órgãos e Conservação

Após anestesia e coleta do sangue, os camundongos passaram por laparotomia abdominal para coleta do fígado e pâncreas, os quais foram lavados com PBS gelado e rapidamente pesados. Partes dos tecidos foram conservados em formaldeído tamponado 10% ou imersos em nitrogênio líquido para congelamento instantâneo, seguido de freezer -80 °C, para avaliações histológicas e moleculares por *western blotting*, respectivamente.

Após a eutanásia dos animais, as carcaças dos mesmos serão armazenadas e identificadas e prontamente congeladas (-20 °C) durante 24 h para posterior entrega ao Biotério Central da UFMA, o qual dará o adequado destino sanitário às mesmas.

4.2.2.6 Gordura Hepática

Para avaliação da gordura hepática foi utilizado a metodologia de Freedman *et al.* com algumas modificações (Freedman *et al.*, 2005). Assim, 500 mg de tecido foram homogeneizados com 5 ml da mistura de clorofórmio/metanol (2:1) para serem deixados *overnight* (16 horas; 4-8 °C) para a extração das gorduras. Em seguida, o tecido foi separado por filtração e ao filtrado adicionado NaCl 0,9% (1 salina: 5 filtrado). Essa mistura foi agitada, deixada em repouso por 2 horas e centrifugada para separação das fases metanólica e clorofórmica. Um volume específico desta fase orgânica foi coletado e seco, ficando apenas a massa de gordura sólida, que foi pesada. Por fim, essa gordura foi ressuspensa em Triton x-100/metanol (2:1) para determinação das concentrações de triglicerídeos e colesterol através de ensaios enzimáticos colorimétricos.

4.2.2.7 Histologia

Após fixação em formol 10% tamponado, os tecidos passaram pelos processos de desidratação, diafanização e inclusão, para posterior microtomia com cortes de 5 µm de espessura e coloração com hematoxilina/eosina. As lâminas foram analisadas, em microscópio de luz (100x e 400x), segundo o critério de *score* proposto por Kleiner *et al.* para a classificação do grau de esteatose e esteato-hepatite (Kleiner *et al.*, 2005).

4.2.2.8 Expressão Proteica de Marcadores do Estresse do RE por Western Blotting

Cerca de 100 mg de amostras do tecido hepático foi homogeneizado em tampão de lise RIPA acrescido de inibidores de proteases (1 mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF). Em seguida, as amostras de lisado foram centrifugadas (14.000g, 10 min, 4°C). O sobrenadante foi coletado, e a concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford. Amostras de 50 ug/ml de proteínas serão acrescidas de tampão de amostra (2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 60 mM Tris pH 6,8, 5% de mercaptoetanol, e 0,01% de azul de bromofenol) e submetidas à eletroforese em um sistema SDS-PAGE, gel 10% de poliacrilamida (1,5 M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad) em aparelho *semi-dry transfer* (Biorad). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio de 5% de leite desnatado (Molico) em tampão TBS-T (50 mM de tampão Tris, pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20) por 2 horas a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpos primários contra as proteínas marcadoras do ERE: GRP78 (1:1000, KDEL ENZO ADI-SPA-827), PDI (1:1000, THERMOFISHER MA3-019), ATF4 (1:1000, INVITROGEN MA5-32364), CHOP (1:2000, THERMOFISHER MA1-25) *overnight* a 4°C. Como controle de peso molecular foi utilizado β -actina (1:10000, INVITROGEN MA5-15739). Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução contendo anticorpo secundário (Sigma-Aldrich) conjugado a peroxidase e expostas ao sistema de detecção *SuperSignal™ West Pico Plus* (Thermo Scientific). Os sinais (bandas) obtidos foram detectados pelo escâner de membrana *C-DIGIT* (LI-COR) e a expressão das proteínas determinada por densitometria das bandas utilizando o programa gratuito *Image Studio Lite* (LI-COR).

4.2.2.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos com esses animais foram expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (EPM). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. As diferenças entre os vários grupos foram detectadas para um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) pelo teste de *Man Whitney* para amostras não-paramétricas ou teste *t-Student* e/ou análise de variância (ANOVA; *Tukey*) para amostras paramétricas.

4.2.3 Resultados

4.2.3.1 Parâmetros Morfométricos

No presente estudo, a exposição contínua à sacarose (grupo DRS) foi capaz de induzir alterações morfométricas nos animais. Não houve diferença significativa no peso dos animais até a décima segunda semana de acompanhamento (CTR: $37,29 \pm 1,357$ g ;DRS: $39,32 \pm 1,303$ g; DRS/ESP $41,85 \pm 1,457$ g). No entanto, da décima terceira semana até o final do acompanhamento, os animais expostos à dieta rica em sacarose apresentaram aumento de massa corpórea quando comparados ao CTR. (CTR: $38,36 \pm 1,351$ g; DRS: $45,70 \pm 2,768$ g; DRS/ESP: $49,75 \pm 1,383$ g). Durante todo o período de acompanhamento, o consumo energético foi maior nos animais DRS e DRS/ESP do que nos animais CTR (CTR: $2,890 \pm 0,1003$ kcal/10 g de peso corporal/semana; DRS: $13,40 \pm 0,9819$ kcal/10 g de peso corporal/semana; DRS/ESP: $14,55 \pm 0,4105$ kcal/10 g de peso corporal/semana) (Figura 8). Ao final do acompanhamento, os animais alimentados com dieta rica em sacarose apresentaram maior acúmulo de gordura corporal observado pela análise do Índice de Lee (CTR: $320,1 \pm 3,783$ g/cm³; DRS: $339,3 \pm 3,959$ g/cm³; $342,1 \pm 3,6,2$ g/cm³).

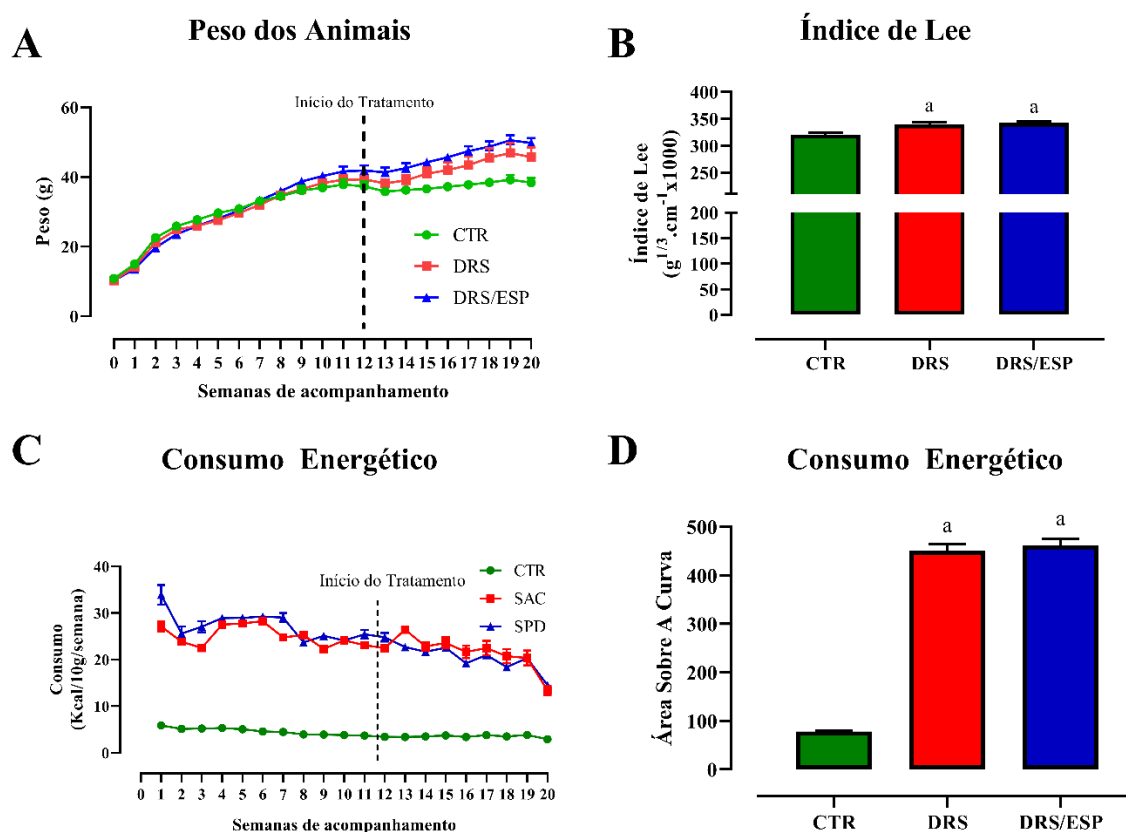


Figura 10. Parâmetros morfométricos. A, peso dos animais (g); B, Índice de Lee ($\text{g}^{1/3}/\text{cm}^3 \times 1000$); C, consumo energético ($\text{Kcal}/10\text{g/semana}$); D, área sobre a curva do consumo energético. Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; $n = 7$); ração padrão e solução de sacarose; ração padrão e solução de sacarose (DRS; $n = 7$); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; $n = 7$). Pontos e barras representam média + SEM (One-Way ANOVA, Tukey). “a” significa $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; “b” significa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DRS.

Considerando o efeito da dieta no peso e consumo energético, analisou-se em seguida como isso influenciou a distribuição e o peso dos depósitos de gordura. É possível observar que os animais expostos à dieta rica em sacarose apresentaram maior acúmulo de tecido adiposo branco retroperitoneal (CTR: $0,083 \pm 0,015$ g/10 g de peso corporal; DRS: $0,154 \pm 0,015$ g/10 g de peso corporal; DRS/ESP: $0,162 \pm 0,011$ g/10 g de peso corporal), tecido adiposo branco periovariano (CTR: $0,082 \pm 0,015$ g/10 g de peso corporal; DRS: $0,863 \pm 0,078$ g/10 g de peso corporal; DRS/ESP: $0,952 \pm 0,071$ g/10 g de peso corporal) e tecido adiposo branco mesentérico (CTR: $0,160 \pm 0,022$ g/10 g de peso corporal; DRS: $0,292 \pm 0,018$ g/10 g de peso corporal; DRS/ESP: $0,314 \pm 0,022$ g/10 g de peso corporal). Em nenhum dos casos, o tratamento oral com ESP conseguiu reverter esse acúmulo. No entanto, o tratamento oral com essa poliamina aumentou os depósitos de tecido adiposo marrom (CTR: $0,039 \pm 0,002$ g/10 g de peso corporal; DRS: $0,045 \pm 0,005$ g/10 g de peso corporal; DRS/ESP: $0,062 \pm 0,005$ g/10 g de peso corporal), (Figura 9).

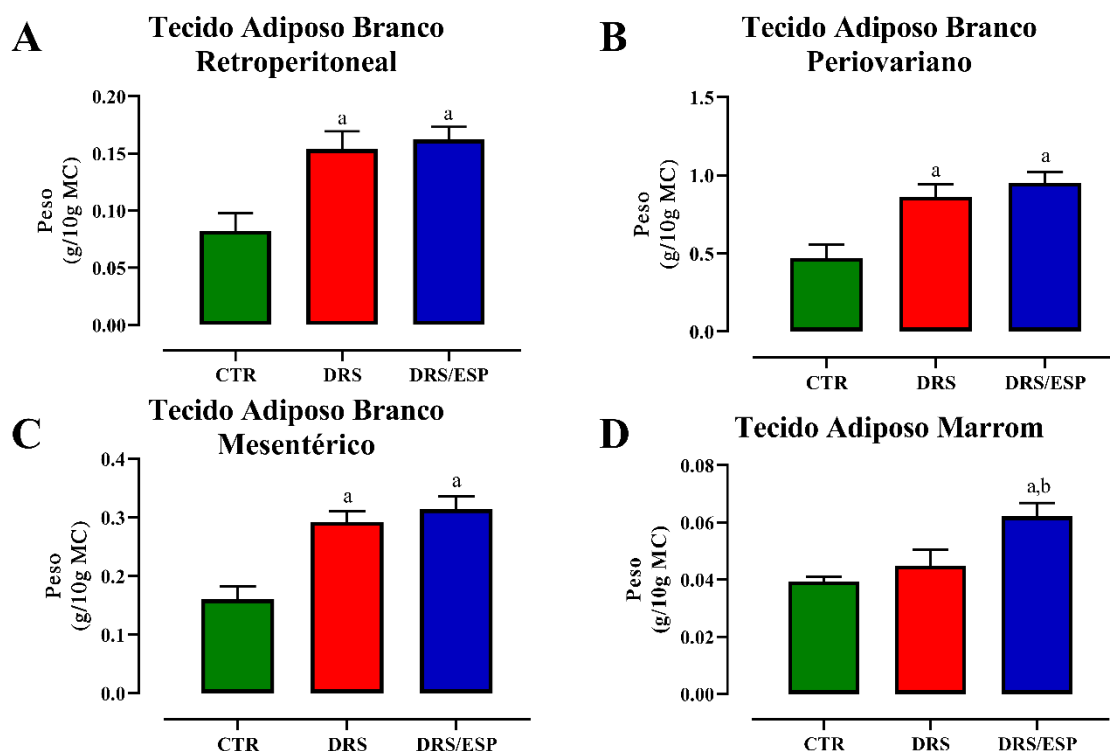


Figura 11. Depósitos de tecido adiposo. A, tecido adiposo branco retroperitoneal (g/10 g de massa corporal); B, tecido adiposo branco periovariano (g/10 g de massa corporal); C, tecido adiposo branco mesentérico (g/10 g de massa corporal); D, tecido adiposo marrom subescapular (g/10 g de massa corporal). Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; n = 7); ração padrão e solução de sacarose (DRS; n = 7); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; n = 7). Pontos e barras representam média + SEM (One-Way ANOVA, Tukey). “a” significa $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; “b” significa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DRS.

4.2.3.2 Parâmetros Bioquímicos Séricos

Os dados sobre o peso dos tecidos adiposos sugerem um impacto no metabolismo lipídico, que é corroborado pelos resultados bioquímicos séricos. A exposição à dieta rica em sacarose teve um impacto negativo no perfil bioquímico sérico dos animais. No entanto, o tratamento oral com ESP resultou em melhorias nesse perfil. Os níveis séricos de triglicerídeos diminuíram significativamente no grupo DRS que recebeu a ESP em relação aquele que não foi tratado (DRS: $139,9 \pm 2,432$ mg/dl; DRS/ESP: $105,9 \pm 8,439$ mg/dl). Por outro lado, ambos os grupos expostos à dieta rica em sacarose apresentaram aumento nos níveis séricos de colesterol (CTR: $70,81 \pm 2,491$ mg/dl; DRS: $104,5 \pm 6,947$ mg/dl; DRS/ESP: $105,2 \pm 3,65$ mg/dl) (Figura 10).

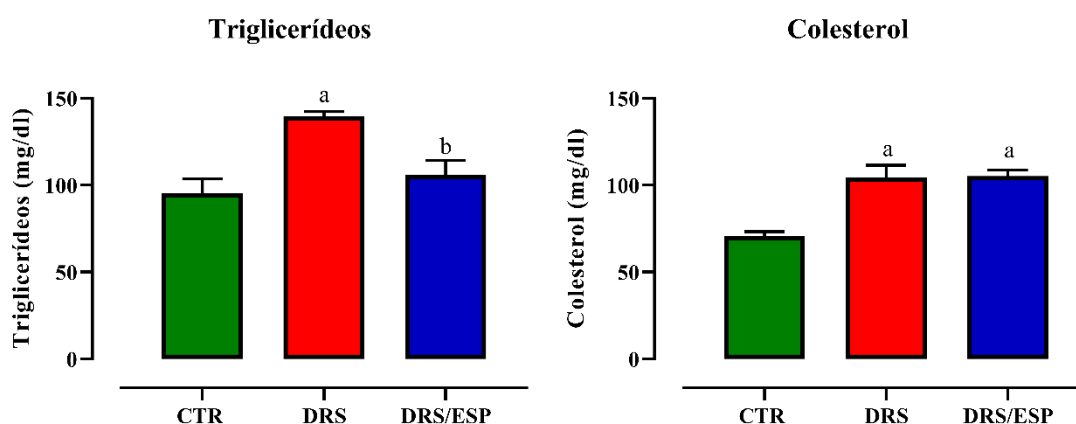


Figura 12. Parâmetros bioquímicos séricos. A, Triglicerídeos sérico (mg/dl); B, colesterol sérico (mg/dl). Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; n = 7); ração padrão e solução de sacarose; ração padrão e solução de sacarose (DRS; n = 7); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; n = 7). Pontos e barras representam média + SEM (One-Way ANOVA, Tukey). “a” significa $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; “b” significa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DRS.

4.2.3.3 Homeostase Glicêmica

Com base nas alterações sobre o perfil lipídico, a dieta rica em sacarose também mostrou influenciar significativamente a regulação da glicose, como demonstrado pelos dados a seguir. A exposição à sacarose induziu a DM2, pois provocou uma hiperglicemia de jejum quando comparado aos animais alimentados com dieta padrão (CTR: $111,5 \pm 2,012$ mg/dl; DRS: $141,3 \pm 6,747$ mg/dl; DRS/ESP: $139,7 \pm 8,958$ mg/dl). O tratamento com a ESP não conseguiu reverter esse processo (CTR: $122,7 \pm 3,853$ mg/dl; DRS: $150 \pm 6,543$ mg/dl; DRS/ESP: $152,2 \pm 3,458$ mg/dl). A tolerância a glicose foi avaliada através do declínio dos níveis séricos de glicemia durante o GTT e o cálculo da área sobre a curva demonstra uma melhora na homeostase glicídica por parte dos animais DRS/ESP quando comparados ao grupo DRS (CTR: 30076 ± 12000 ; DRS: 40380 ± 3400 ; DRS/ESP: $36593 \pm 909,5$). De forma semelhante, a ESP conseguiu atenuar a resistência à insulina através do cálculo do índice TyG (CTR: $8,650 \pm 0,09154$; DRS: $9,272 \pm 0,03484$; DRS/ESP: $8,982 \pm 0,09805$) (Figura 11).

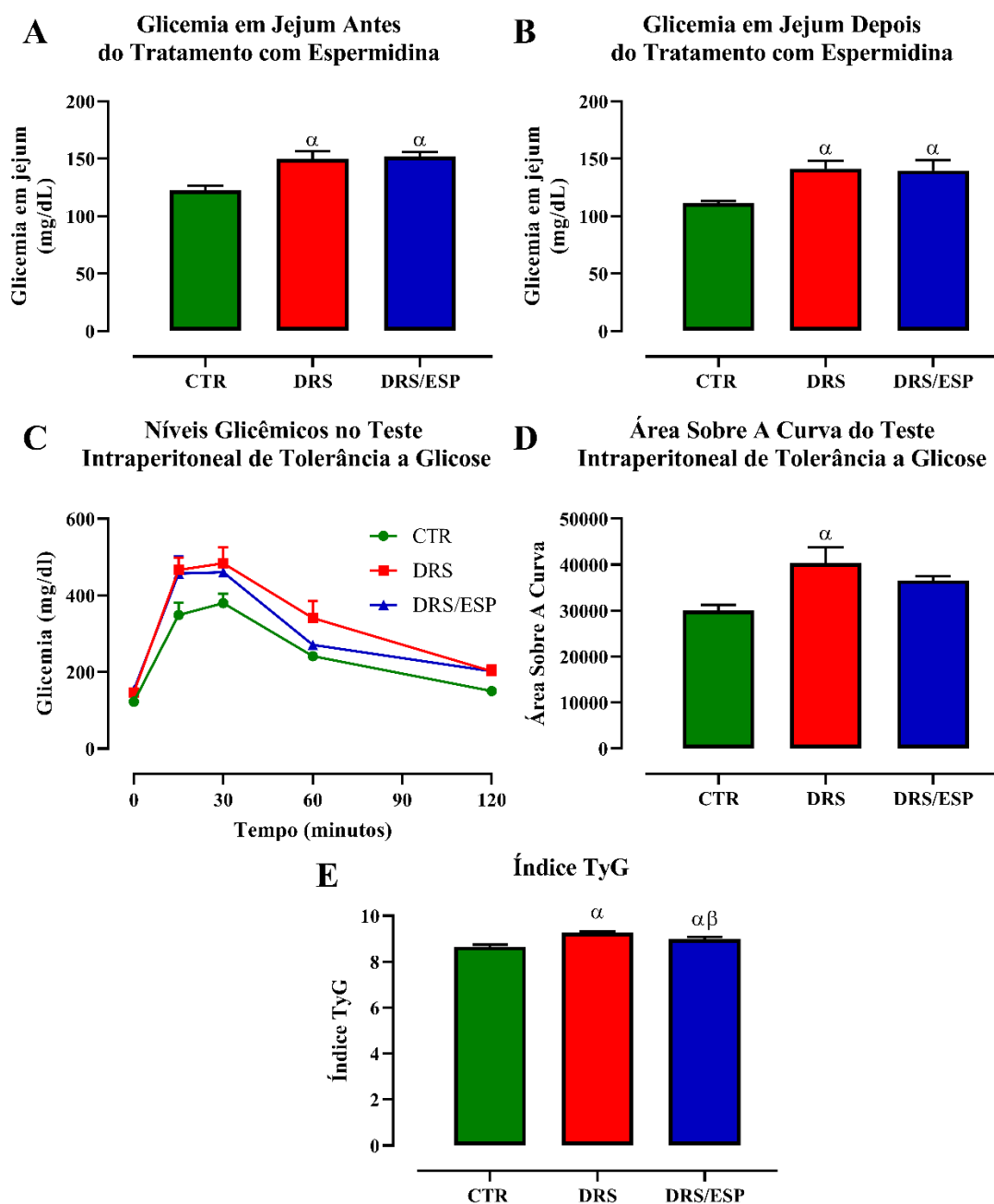


Figura 13. Parâmetros glicêmicos. A, glicemia em jejum antes do tratamento com espermidina (mg/dl); B, glicemia em jejum após o tratamento com espermidina; C, níveis glicêmicos no teste intraperitoneal de tolerância a glicose (mg/dl); D, área sobre a curva do teste intraperitoneal de tolerância a glicose; E, índice TyG. Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; n = 7); ração padrão e solução de sacarose; ração padrão e solução de sacarose (DRS; n = 7); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; n = 7). Pontos e barras representam média + SEM (One-Way ANOVA, Tukey). “a” significa $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; “b” significa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DRS.

4.2.3.4 Homeostase Lipídica

Dado o impacto na homeostase glicêmica, avaliou-se a influência na homeostase lipídica. Para caracterizar melhor os efeitos da dieta e do tratamento com ESP sobre a

adiposidade dos animais, medimos a lipólise *ex vivo* do tecido adiposo periovariano sobre três condições: uma condição basal, uma condição estimulada com isoproterenol e uma condição inibida por insulina. Na condição basal, os animais expostos à sacarose mostraram uma redução na taxa de liberação de glicerol em comparação com o controle (CTR: $7,494 \pm 0,3848 \mu\text{g/mg/h}$; DRS: $4,29 \pm 0,3939 \mu\text{g/mg/h}$; DRS/ESP: $5,076 \pm 0,2864 \mu\text{g/mg/h}$). Mesmo quando estimulados com isoproterenol, uma agonista adrenérgico conhecido por aumentar a lipólise, os animais apresentaram uma redução da taxa lipolítica em comparação com o grupo CTR (CTR: $16,62 \pm 1,521 \mu\text{g/mg/h}$; DRS: $11,18 \pm 0,648$; DRS/ESP: $10,63 \pm 1,055 \mu\text{g/mg/h}$). Quando a lipólise foi inibida pela insulina, o grupo DRS apresentou um aumento na taxa de liberação de glicerol em comparação com o controle, em contrapartida a ESP atenuou essa taxa demonstrando uma melhora na sensibilidade à insulina (CTR: $3,36 \pm 0,5285 \mu\text{g/mg/h}$; DRS: $5,25 \pm 0,3799 \mu\text{g/mg/h}$; DRS/ESP: $4,5 \pm 0,3759 \mu\text{g/mg/h}$) (Figura 12).

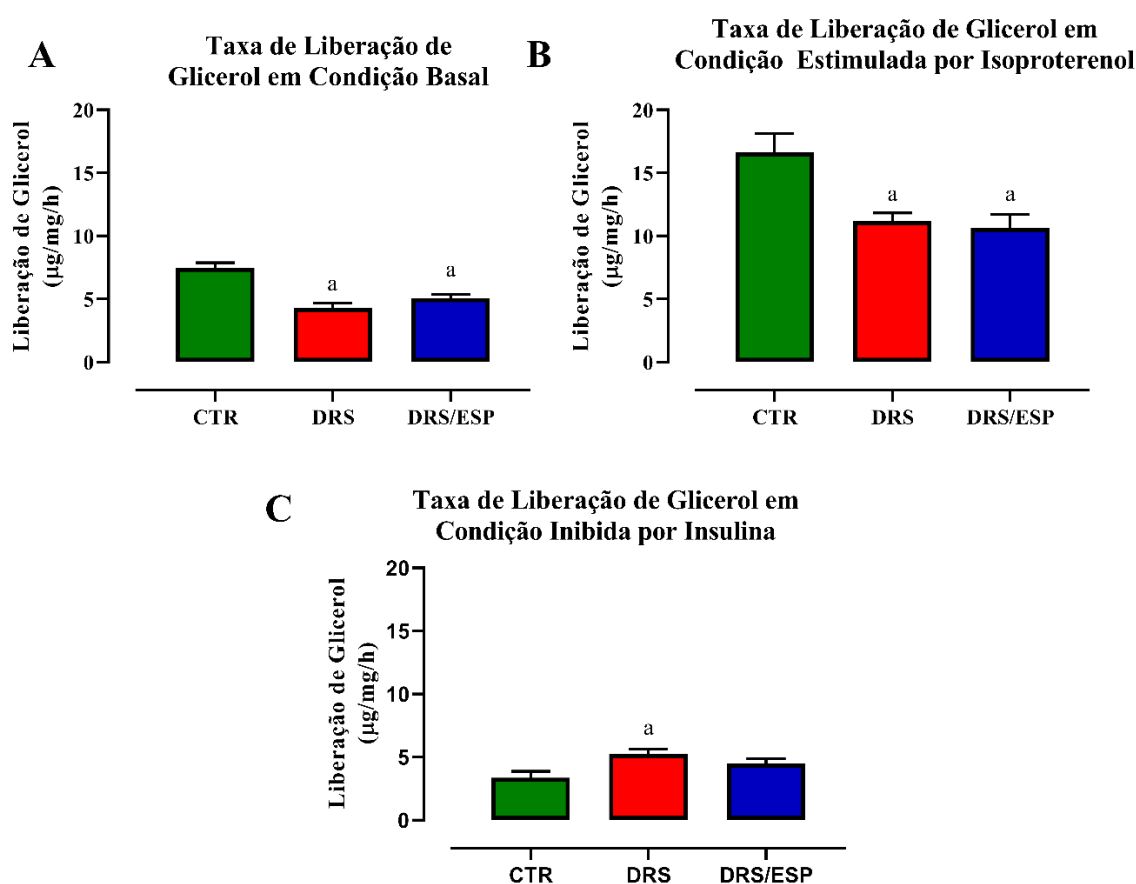


Figura 14. Lipólise *ex vivo* do tecido adiposo branco periovariano. A, Taxa de liberação de glicerol sob condições basais ($\mu\text{g/mg/h}$); B, Taxa de liberação de glicerol em condição estimulada por isoproterenol ($\mu\text{g/mg/h}$); C, Taxa de liberação de glicerol em condição inibida por insulina ($\mu\text{g/mg/h}$). Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; $n = 7$); ração padrão e solução de sacarose; ração padrão e solução de sacarose (DRS; $n = 7$); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; $n = 7$). Pontos e barras representam média + SEM (One-Way ANOVA, Tukey). “a” significa $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; “b” significa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DRS.

4.2.3.5 Parâmetros Hepáticos

Os efeitos na homeostase lipídica motivaram a investigação dos parâmetros hepáticos, visto que o fígado desempenha um papel crucial na regulação metabólica. Como era de se esperar, os animais expostos à sacarose apresentaram maiores acúmulos hepáticos de gordura total, triglicerídeos e colesterol. Entretanto, o tratamento com a ESP reduziu o peso do fígado dos animais (CTR: $0,4858 \pm 0,02064$ g/10 g de peso corporal; DRS: $0,5528 \pm 0,04626$ g/10 g de peso corporal; DRS/ESP: $0,4242 \pm 0,0313$ g/10 g de peso corporal). Esse efeito da ESP foi acompanhado pelas diminuições da gordura total (CTR: $251,9 \pm 11,06$ mg/g de fígado; DRS: $391,4 \pm 48,48$ mg/g de fígado; DRS/ESP: $357,6 \pm 38,33$ mg/g de fígado) e dos triglicerídeos hepáticos (CTR: $6,305 \pm 0,8054$ mg/g de fígado; DRS: $13,36 \pm 1,729$ mg/g de fígado; DRS/ESP: $10,75 \pm 1,807$ mg/g de fígado). No entanto, não houve diferença nas concentrações de colesterol hepático entre os grupos (CTR: $1,503 \pm 0,197$ mg/g de fígado; DRS: $1,951 \pm 0,131$ mg/g de fígado; DRS/ESP: $1,82 \pm 0,1239$ mg/g de fígado) conforme observado na Figura 13.

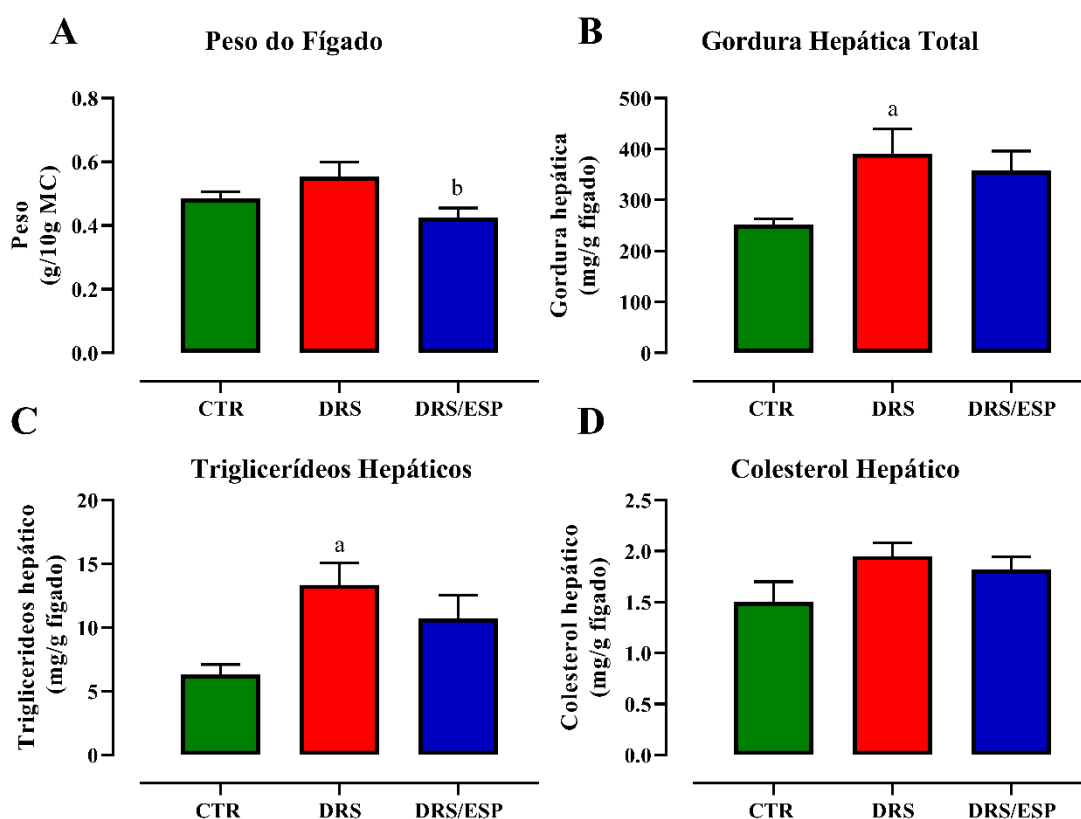


Figura 15. Parâmetros hepáticos. A, Peso do fígado (g/10g de massa corporal); B, Gordura hepática total (mg/g de fígado); C, triglicerídeos hepáticos (mg/g de fígado); D, colesterol hepático (mg/g de fígado). Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; n = 7); ração padrão e solução de sacarose; ração padrão e solução de sacarose (DRS; n = 7); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; n = 7). Pontos e barras representam média + SEM (One-Way ANOVA, Tukey). “a” significa $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; “b” significa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DRS.

4.2.3.6 Histologia Hepática

Para complementar os dados anteriores, realizou-se análises histológicas do tecido hepático. A coloração com hematoxilina e eosina foi empregada para detectar acúmulo lipídico e inflamação. No grupo controle, o tecido hepático apresentou estruturas preservadas sem evidentes alterações morfológicas. Contudo, nos camundongos DRS, o tecido hepático apresentou acúmulo significativo de vacúolos lipídicos no citoplasma dos hepatócitos, caracterizando esteatose hepática. Além disso, houve infiltração de células inflamatórias. Entretanto, nos animais tratados com ESP, houve uma redução da esteatose hepática, com menor quantidade de vacúolos lipídicos no citoplasma dos hepatócitos. A inflamação também foi reduzida quando comparada ao grupo não tratado (Figura 14; Tabela 7).

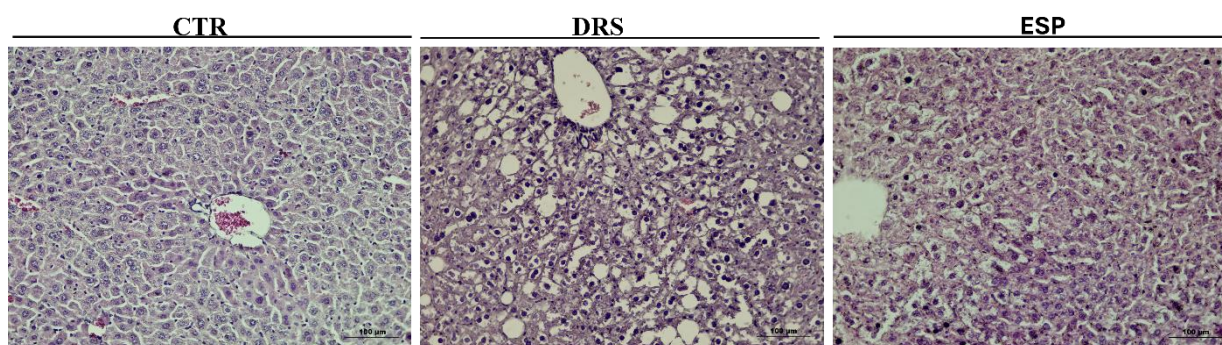


Figura 16. Análise histológica de fígados após tratamento com espermidina. Seções de amostras de fígado coradas com hematoxilina e eosina para visualização das morfologias dos hepatócitos. Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; n = 7); ração padrão e solução de sacarose; ração padrão e solução de sacarose (DRS; n = 7); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; n = 7).

Tabela 7. Score de atividade de doença hepática gordurosa não-alcoolica.

Score de Atividade	CTR	DRS	ESP
Ballooning	0,00 ± 0,00	0,80 ± 0,20 ^a	0,29 ± 0,18
Inflamação	0,25 ± 0,25	1,6 ± 0,25 ^a	0,43 ± 0,20 ^b
Esteatose	0,75 ± 0,25	2,6 ± 0,25 ^a	1,86 ± 0,34
Score Total	1,00 ± 0,41	5,00 ± 0,55 ^a	2,57 ± 0,57 ^b

Grupos experimentais que receberam ração padrão (CTR; n = 7); ração padrão e solução de sacarose; ração padrão e solução de sacarose (DRS; n = 7); ração padrão, solução de sacarose e espermidina (DRS/ESP; n = 7). Os valores representam a média ± erro padrão da média comparada por teste de variância (One-Way ANOVA, Tukey). “a” significa p<0,05 quando comparado ao CTR; “b” significa p<0,05 quando comparado ao grupo DRS.

4.2.3.7 Expressão Proteica

Os achados histológicos sugerem alterações na estrutura hepática que podem estar associadas a mecanismos subjacentes. Para entender melhor os mecanismos moleculares por

trás das alterações observadas, analisou-se a expressão de proteínas-chave relacionadas ao estresse do retículo endoplasmático. Nessa avaliação, observou-se uma redução significativa na expressão de GRP78 (CTR: $12,91 \pm 2,297$; DRS: $5,848 \pm 1,112$; DRS/ESP: $9,565 \pm 1,917$), PDI (CTR: $0,1968 \pm 0,04743$; DRS: $0,04745 \pm 0,01079$; DRS/ESP: $0,1206 \pm 0,04146$) e ATF4 (CTR: $0,06324 \pm 0,008407$; DRS: $0,03239 \pm 0,005104$; DRS/ESP: $0,05245 \pm 0,009378$) nos camundongos alimentados com sacarose quando comparados ao grupo controle. No entanto, o tratamento com ESP restaurou os níveis de expressão dessas proteínas para valores próximos do grupo controle. Em contrapartida, não houve diferença significativa na expressão proteica de CHOP ($0,06007 \pm 0,01099$; DRS: $0,06964 \pm 0,01288$; DRS/ESP: $0,07186 \pm 0,01649$) entre os grupos experimentais. Esses resultados indicam que a ESP pode exercer um efeito melhorando a homeostase do retículo endoplasmático (Figura 15).

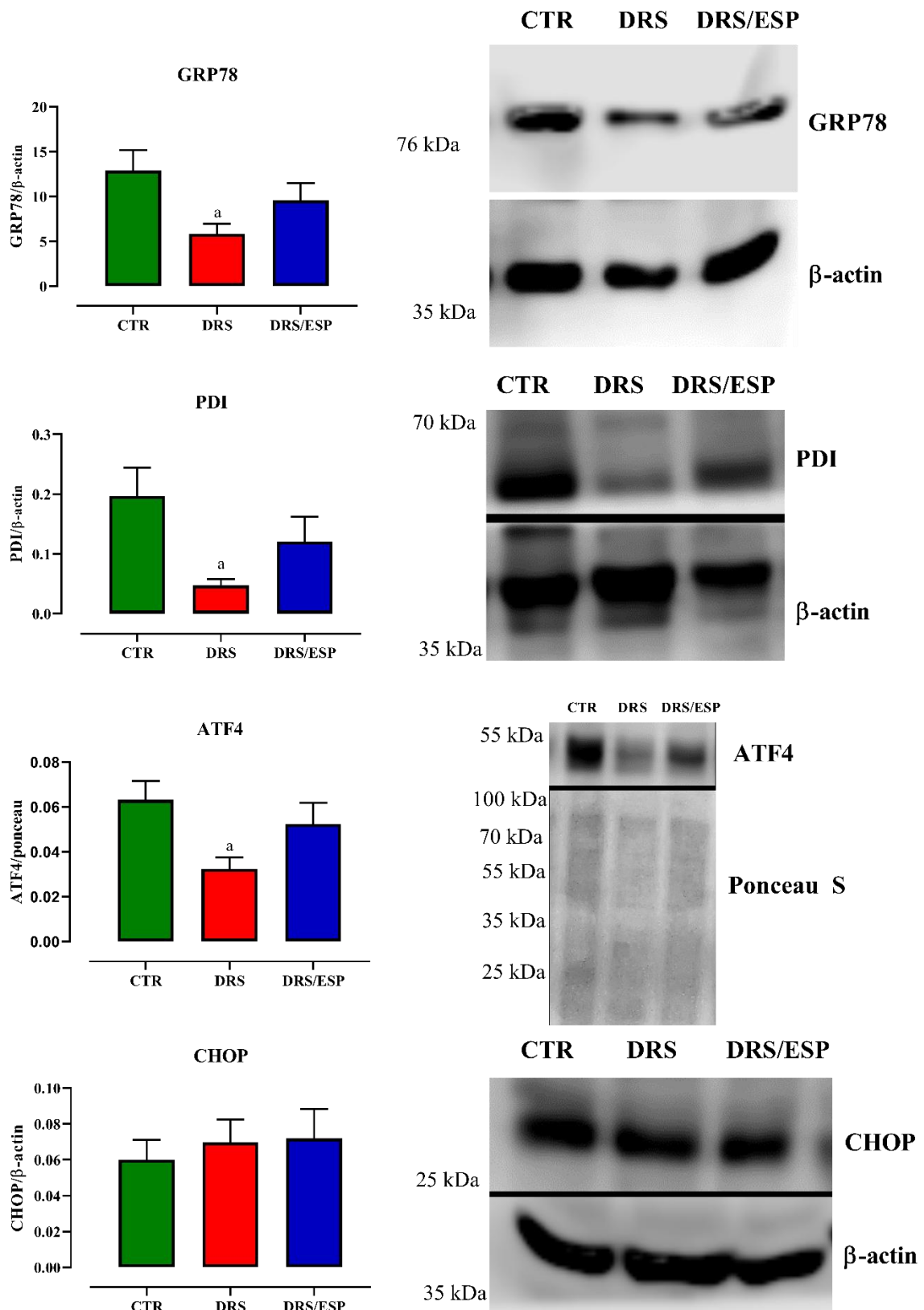


Figura 17. Expressão proteica dos marcadores do estresse do retículo endoplasmático. Expressões proteicas relativas a marcadores envolvidos na sinalização adaptativa da RPD (GRP78, PDI, ATF4) e pró-apoptótica (CHOP) avaliadas no fígado de camundongos alimentados com ração padrão (CTR, n=7), dieta rica em sacarose (DRS, n=7) e tratados com espermidina (DRS/ESP, n=7). As proteínas são expressas como uma densidade relativa normalizada pela anti β -actina. As imagens de manchas são representativas daquelas encontradas nos géis de

corpo. As barras representam média $\pm$ erro padrão da média avaliadas por ANOVA considerando “a” como diferente significativamente do CTR.

4.2.4 Discussão

Neste estudo, demonstramos que a administração de espermidina em camundongos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) induzido por dieta rica em sacarose resulta em uma significativa melhora no perfil lipídico e na homeostase glicêmica. Observou-se uma redução nos níveis de triglicerídeos, bem como uma melhora na tolerância à glicose, corroborando a hipótese de que a ESP exerce efeitos metabólicos benéficos. Além disso, os dados indicam uma possível modulação na expressão de marcadores do estresse do retículo endoplasmático, como GRP78, PDI e ATF4, sugerindo que essa poliamina pode modular o estresse celular, um fator relevante na fisiopatologia do DM2.

Inicialmente, não foram observadas diferenças significativas no peso entre os grupos experimentais. Contudo, a partir da décima segunda semana de acompanhamento, os animais expostos à dieta rica em sacarose (grupo DRS e DRS/ESP) manifestaram um aumento significativo na massa corpórea, acompanhado por um aumento no consumo energético e acúmulo de gordura corporal. Esses resultados são atribuídos, em grande parte, ao comportamento preferencial dos animais em relação à sacarose, embora houvesse a disponibilidade de duas mamadeiras, uma contendo água e a outra contendo solução de sacarose. Um dos motivos para essa elevada ingestão de açúcares reside em seu sabor adocicado. A sacarose ativa os receptores de sabor doce (como T1R2 e T1R3, por exemplo) e seu componente a jusante (TrpM5) na língua, desencadeando uma resposta de dopamina no cérebro que pode estimular a ingestão contínua de açúcar e explicar o comportamento preferencial dos animais pela mamadeira com solução de sacarose. Além disso, o metabolismo da frutose parece ser determinante para esse comportamento (Verharen *et al.*, 2023).

O aumento progressivo do consumo de sacarose, resulta em um incremento correspondente no consumo energético e, conseqüentemente, maior armazenamento de energia na forma de depósitos de gordura. O efeito obesogênico do consumo de sacarose líquida já havia sido avaliado por Souza Cruz e colaboradores (2020), onde resultados semelhantes já foram observados com uma quantidade calórica bem semelhante a utilizada no presente estudo (Souza Cruz *et al.*, 2020). Dados do nosso grupo de pesquisa, obtidos com a administração de uma dieta rica em sacarose sólida, apresentaram resultados similares. Flister *et al.* (2018) observaram um aumento significativo nos depósitos de gordura retroperitoneal, mesentérica e

periepididimal em camundongos alimentados com uma dieta contendo 25% de sacarose por períodos de 30, 60 e 90 dias (Flister *et al.*, 2018). De forma semelhante, França *et al.* (2020) demonstraram que camundongos submetidos a uma dieta rica em sacarose por 60 e 90 dias exibiram acúmulo aumentado desses compartimentos adiposos (França *et al.*, 2020).

Todos os depósitos adiposos brancos analisados demonstraram um incremento nos dois grupos de animais expostos à sacarose. Considerando que essas alterações no acúmulo de gordura estão frequentemente associadas a disfunções metabólicas, foi relevante avaliar se essas modificações refletiram em mudanças nos parâmetros bioquímicos. A investigação sobre os efeitos da ESP sobre os níveis lipídicos séricos tem gerado resultados divergentes na literatura científica. Em nosso estudo, observamos uma redução significativa nos níveis de triglicerídeos séricos após o tratamento com ela, embora os níveis de colesterol não tenham apresentado alterações. Esses achados corroboram parcialmente com os resultados de estudos anteriores. Por exemplo, o estudo de Gao *et al.* (2018) demonstrou que o tratamento intraperitoneal com ESP em animais expostos a uma dieta hiperlipídica resultou na redução tanto dos níveis séricos de triglicerídeos quanto de colesterol. Embora a dose e a duração do tratamento tenham sido inferiores às utilizadas em nosso estudo, essa pesquisa sugere que a espermidina tem o potencial de modular significativamente os níveis lipídicos em condições de dieta hiperlipídica (Gao *et al.*, 2018). No entanto, o estudo de Wang *et al.* (2021) relatou resultados diferentes. Eles não observaram diferenças nos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol em animais alimentados com uma dieta rica em gordura e tratados com ESP via água de beber por um período de 4 semanas. Essa disparidade nos resultados pode ser atribuída a diferenças metodológicas, como a formulação da dieta, a via de administração e a duração do tratamento (Wang, D. *et al.*, 2021). Esses estudos indicam que os efeitos dessa poliamina sobre os lipídios séricos podem ser influenciados por uma variedade de fatores experimentais, destacando a necessidade de mais investigações para elucidar completamente seus efeitos nesse contexto.

A redução significativa nos níveis séricos de triglicerídeos após o tratamento com ESP em nosso estudo reforça a hipótese de seu efeito positivo no metabolismo lipídico, mesmo sem impacto nos níveis de colesterol. Esses resultados se alinham parcialmente ao estudo de Gao *et al.* (2018), que observou reduções tanto nos triglicerídeos quanto no colesterol em animais alimentados com dieta rica em gordura e tratados via intraperitoneal com ESP (Gao *et al.*, 2018). Por outro lado, a pesquisa de Wang *et al.* (2021) não relatou diferenças significativas nos níveis lipídicos sob tratamento oral com ESP, sugerindo que variações nos protocolos,

como a dose, via de administração e duração, podem influenciar os efeitos observados (Wang, D. *et al.*, 2021).

A exposição à sacarose resultou em um comprometimento da homeostase glicêmica dos animais, como evidenciado pelos aumentos nos níveis séricos de glicose em jejum e nos resultados do teste intraperitoneal de tolerância à glicose (GTT). No entanto, na análise da área sob a curva do GTT, o grupo DRS revelou um comprometimento na tolerância à glicose, que foi atenuado pelo tratamento com ESP. Em estudo conduzido por Wang *et al.* (2021), a suplementação oral via água de beber de 5 mM espermidina por 4 semanas não foi capaz de melhorar a intolerância à glicose em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura (DRG), e não houve redução nos níveis de glicose nesses camundongos em comparação com os não tratados (Wang, D. *et al.*, 2021). No entanto, os resultados do GTT relatados por Ma *et al.* (2021) indicaram uma leve melhora na intolerância à glicose em camundongos alimentados com DRG após o tratamento com ESP oral na dose de 20 mg/kg por 8 semanas (Ma; Ni; Hu; *et al.*, 2021). Além disso, Liao *et al.* (2021) observaram melhora na tolerância à glicose em camundongos expostos à dieta rica em gordura que foram tratados via intraperitoneal com 50 mg/kg de espermidina por 6 semanas (Liao *et al.*, 2021). Ma *et al.* (2020) também observaram uma melhora na tolerância à glicose em camundongos expostos à dieta hiperlipídica após o tratamento com diferentes concentrações (5, 10 e 20 mg/kg) de ESP via oral por 16 semanas. (Ma *et al.*, 2020).

Neste trabalho, a ESP demonstrou melhorar a RI em animais expostos à sacarose, conforme evidenciado pelo índice TyG. Ma *et al.* (2020) conduziram uma investigação detalhada sobre a sensibilidade à insulina em animais submetidos ao tratamento com ESP oral em combinação com uma dieta hiperlipídica. Utilizando o índice HOMA-IR como medida da RI, observaram melhoras substanciais após o tratamento oral em animais alimentados com essa dieta específica. De forma semelhante, Wang *et al.* (2021) investigaram os efeitos da espermidina na sensibilidade à insulina em animais expostos a uma dieta hiperlipídica. Utilizando o teste de tolerância à insulina como métrica, também observaram maior sensibilidade à insulina em animais que receberam tratamento com ESP via oral (Wang, D. *et al.*, 2021). Esses resultados fornecem apoio adicional à capacidade dessa substância em atenuar a RI tanto de dieta ricas em sacarose como em gorduras, destacando, assim, seu potencial terapêutico no contexto de distúrbios metabólicos.

Diante destes resultados, decidimos analisar a responsividade do tecido adiposo branco (TAB) periovariano pelo teste da lipólise *ex vivo* em três condições distintas: basal, estimulada com isoproterenol e inibida pela presença da insulina. Na condição basal, os animais

alimentados com sacarose apresentaram uma redução na taxa de liberação de glicerol em comparação ao grupo CTR. Na condição estimulada por isoproterenol os animais DRS e DRS/ESP também apresentaram redução na liberação de glicerol em comparação ao grupo CTR. Este resultados favorecem o maior acúmulo de gordura promovida pelo excesso de sacarose e corroboram com resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa (Pinto *et al.*, 2016; Sanches *et al.*, 2016; Sousa *et al.*, 2018).

Além disso, o ensaio com ISO indica que a resposta à estimulação adrenérgica nesses animais deve estar comprometida. De fato, as catecolaminas influenciam a lipólise no TAB depois de se ligarem a diferentes subtipos de adrenoreceptores, sendo o β_3 , o mais ativo em roedores. As proteínas G acopladas aos beta-adrenérgicos ativam adenilato ciclase para que a produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) aumente. Isso, por sua vez, ativa o complexo proteína quinase A (PKA), levando à fosforilação da lipase hormônio-sensível (HSL). A fosforilação de HSL desencadeia a translocação da enzima para a gota lipídica e a consequente quebra desta (Jocken; Blaak, 2008).

Estudo anterior do nosso grupo demonstrou que a sensibilidade insulínica em TAB perigonadal está comprometida em camundongos machos alimentado com dieta rica em sacarose sólida (França *et al.*, 2020). Este estudo corrobora esses dados expondo camundongos fêmeas a uma dieta rica em sacarose líquida. A insulina é o hormônio antilipolítico mais potente no tecido adiposo. A degradação do AMPC é o principal mecanismo pelo qual a insulina antagoniza a lipólise induzida por catecolamina. Além da degradação de AMPC, existem mecanismo adicionais através dos quais a insulina pode antagonizar a lipólise induzida por catecolaminas. A insulina pode inibir adenilato ciclase e internalizar os receptores β -adrenérgicos. (Jocken; Blaak, 2008).

As alterações observadas nos parâmetros bioquímicos indicam uma influência positiva da ESP sobre o metabolismo lipídico e glicêmico. Considerando que o fígado é o principal órgão envolvido na regulação desses processos metabólicos, é essencial examinar como essas alterações se manifestam no tecido hepático. Os resultados demonstram que a ingestão de sacarose prejudicou de forma significativa o metabolismo lipídico hepático. No entanto, o tratamento com a poliamina atenuou o peso do fígado dos animais, o acúmulo de gordura hepática e triglicerídeos hepáticos. A quantidade de triglicerídeos hepáticos é dependente do balanço relativo entre o influxo lipídico e a remoção de lipídeos. O influxo lipídico pode ser derivado de uma variedade fontes metabólicas, incluindo ingestão dietética, lipólise do tecido adiposo e lipogênese *de novo* (LDN) hepática. Todos esses processos contribuem para o acúmulo de gordura hepática em proporções distintas. A remoção de lipídios é mediada tanto

pela β -oxidação de ácidos graxos mitocondriais quanto pela re-esterificação em triglicerídeos, que são armazenados ou exportados para a circulação sistêmica como lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). A gordura hepática acumula-se diferencialmente de acordo com a composição de ácidos graxos e/ou tipo de carboidratos. Níveis crescente de triglicerídeos hepáticos pode impulsionar a resistência à insulina, o que pode aumentar a taxa de LDN hepática (Hydes *et al.*, 2021).

Complementando os dados bioquímicos hepáticos, a análise histológica do fígado permitiu uma avaliação detalhada das alterações morfológicas associadas à dieta rica em sacarose e ao tratamento com a ESP. Os animais alimentados com a DRS apresentaram um acúmulo significativo de gordura hepática, caracterizado pela presença de esteatose mista (macrovesicular e microvesicular), com presença de baloneamento e infiltração inflamatória. Por outro lado, nos camundongos tratados com ESP, as lâminas histológicas mostraram uma redução visível na deposição lipídica, com diminuição de esteatose e inflamação, indicando um possível efeito protetor da poliamina contra esteato-hepatite induzida pela dieta.

Estudos anteriores já demonstraram esse efeito benéfico da ESP sobre o acúmulo de gordura hepática. Gao *et al.* demonstraram que o tratamento intraperitoneal com ela reverteu o fenótipo de esteatose hepática, incluindo acúmulos de gotículas lipídicas e degeneração de células hepáticas camundongos com obesidade induzida por DRG (Gao *et al.*, 2018). Ni *et al.* também observaram atenuação na deposição lipídica nos fígados de camundongos alimentados com dieta ocidental que receberam ESO na água de beber por 16 semanas (Ni *et al.*, 2022). Enquanto Ma *et al.*, observaram resultados semelhantes em animais alimentados com DRG cuja a suplementação de ESP na água de beber durou apenas 8 semanas (Ma; Ni; Hu; *et al.*, 2021). Esses resultados mostram que, apesar da deposição de gordura hepática derivada de diferentes modelos dietéticos, o tratamento com ESP, administrado por diferentes vias, levou à melhora nos parâmetros hepáticos.

Os resultados da expressão proteica corroboram os achados histológicos, fornecendo uma visão mecanística sobre o impacto da ESP na via de estresse do RE em camundongos com diabetes mellitus tipo 2 induzido por sacarose. A DRS reduziu significativamente a expressão de GRP78, PDI e ATF4, proteínas-chave envolvidas na resposta desse estresse, o que sugere uma possível disfunção na capacidade de lidar com proteínas mal enoveladas e um comprometimento na homeostase celular. No entanto, o tratamento com a poliamina foi capaz de melhorar expressão dessas proteínas, indicando um papel importante na restauração da função do RE. Esses resultados sugerem que essa substância restaura o ambiente intracelular necessário para a manutenção da homeostase hepática. A ausência de uma diferença

significativa na expressão de CHOP reforça que a via apoptótica não foi ativada de forma pronunciada em nenhum dos grupos. Esses dados, inéditos na literatura, são os primeiros a correlacionar a ESP com a melhora do estresse do RE, apontando para um novo mecanismo de ação dessa poliamina no contexto do DM2 e DHGNA induzida por sacarose.

Esses resultados estão em concordância com dados anteriores do nosso grupo de pesquisa, que mostraram que a exposição a uma dieta rica em sacarose sólida resultou na redução da expressão gênica de GRP78, PDI e PERK (proteína *upstream* do ATF4), reforçando a associação entre o estresse do RE e o desenvolvimento de complicações metabólicas (Flister *et al.*, 2018). A redução dessa sinalização, especificamente pela diminuição de GRP78 e PDI, é relevante no contexto do desenvolvimento da DHGNA, como sugerido por estudos que avaliaram dietas ricas em lipídios e frutose (Balakumar *et al.*, 2016; Ozcan *et al.*, 2004).

A superexpressão de GRP78, em particular, demonstrou inibir a lipogênese ao reduzir a ativação do SREBP1-c, um fator-chave na síntese de novo de lipídios (Kammoun *et al.*, 2009). Da mesma forma, a superexpressão de PDI parece exercer um efeito antilipogênico similar, além de estar envolvida na montagem e secreção de partículas de VLDL, o que contribui para a redução do acúmulo de gordura hepática (Wang *et al.*, 2012; Zhang; Wang, 2016). Esses mecanismos são cruciais, pois destacam o papel da ESP na modulação da expressão dessas chaperonas capazes de a homeostase lipídica e prevenção do acúmulo de gordura no fígado.

Portanto, nossos achados, que demonstram que o tratamento com espermidina melhora expressão de GRP78 e PDI, sugerem um possível papel protetor dessa poliamina na regulação do estresse do RE e no combate à lipogênese hepática. Esses resultados são os primeiros a correlacionar diretamente esse composto com a recuperação da função do RE, expandindo o entendimento de seus efeitos no contexto do DM2 e DHGNA.

4.2.5 Conclusão

Com base nos resultados deste estudo, foi possível observar que o tratamento com espermidina em camundongos com diabetes mellitus tipo 2 induzido por dieta rica em sacarose resultou em melhorias significativas nos parâmetros metabólicos. Essa poliamina demonstrou efeitos benéficos na redução dos níveis séricos de triglicerídeos, além de uma melhora na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina. Além disso, o tratamento melhorou a expressão de proteínas envolvidas no estresse do retículo endoplasmático, como GRP78, PDI e ATF4, sugerindo um papel protetor da espermidina na manutenção da homeostase celular hepática.

Além disso, a espermidina não só impactou positivamente o perfil lipídico, como também atenuou o acúmulo de gordura hepática e inflamação, destacando seu potencial como um agente terapêutico promissor para o manejo do diabetes mellitus tipo 2 e DHGNA. Esses achados apontam para a relevância de futuros estudos que explorem o papel dessa substância em diferentes modelos de doenças metabólicas, visando o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos nos dois capítulos desta dissertação, foi possível concluir que a espermidina apresenta um potencial terapêutico promissor no tratamento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2), principalmente por sua ação moduladora sobre o estresse do retículo endoplasmático (ERE) e sua capacidade de melhorar parâmetros metabólicos.

No primeiro capítulo, observou-se que a poliamina possui características físico-químicas e farmacocinéticas favoráveis, com boa biodisponibilidade oral e baixos níveis de toxicidade, o que reforça sua viabilidade como composto terapêutico. Essa análise *in silico* permitiu identificar a segurança e o comportamento farmacológico dela, o que pode facilitar sua aplicabilidade em modelos experimentais.

No segundo capítulo, em um modelo experimental de DM2 induzido por dieta rica em sacarose, o tratamento com espermidina resultou em uma série de efeitos benéficos, incluindo a redução de triglicerídeos séricos, a melhora da tolerância à glicose e a recuperação da expressão de proteínas-chave envolvidas no ERE hepático, como GRP78, PDI e ATF4. Esses achados sugerem que a espermidina não apenas auxilia na homeostase do retículo endoplasmático, mas também promove uma resposta adaptativa favorável contra os efeitos deletérios do DM2 e DHGNA, atenuando a lipogênese hepática e a inflamação associada à resistência à insulina.

Dessa forma, a espermidina emerge como uma molécula com grande potencial terapêutico, capaz de atuar tanto na modulação do ERE quanto na melhora de parâmetros metabólicos críticos para o manejo do DM2 e DHGNA. Esses resultados apontam para a necessidade de novos estudos que explorem a ação dessa poliamina em diferentes modelos de doenças metabólicas, visando ao desenvolvimento de intervenções terapêuticas inovadoras e mais eficazes.

REFERÊNCIAS

- Adhikari, R.; Shah, R.; Reyes-Gordillo, K. *et al.* Spermidine prevents ethanol and lipopolysaccharide-induced hepatic injury in mice. **Molecules**, 26, n. 6, p. 1786, 2021.
- Agoni, C.; Olotu, F. A.; Ramharack, P. *et al.* Druggability and drug-likeness concepts in drug design: are biomodelling and predictive tools having their say? **Journal of molecular modeling**, 26, p. 1-11, 2020.
- Ajoolabady, A.; Kaplowitz, N.; Lebeaupin, C. *et al.* Endoplasmic reticulum stress in liver diseases. **Hepatology**, 77, n. 2, p. 619-639, 2023.
- Akuta, N.; Kawamura, Y.; Fujiyama, S. *et al.* Predictors of insulin secretion in Japanese patients with histopathologically-confirmed non-alcoholic fatty liver disease. **Internal Medicine**, 59, n. 3, p. 329-338, 2020.
- Allagnat, F.; Christulia, F.; Ortis, F. *et al.* Sustained production of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) induces pancreatic beta cell dysfunction and apoptosis. **Diabetologia**, 53, p. 1120-1130, 2010.
- Ameri, K.; Harris, A. L. Activating transcription factor 4. **The international journal of biochemistry & cell biology**, 40, n. 1, p. 14-21, 2008.
- Anderson, J. G.; Ramadori, G.; Ioris, R. M. *et al.* Enhanced insulin sensitivity in skeletal muscle and liver by physiological overexpression of SIRT6. **Molecular metabolism**, 4, n. 11, p. 846-856, 2015.
- Antar, S. A.; Ashour, N. A.; Sharaky, M. *et al.* Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 168, p. 115734, 2023.
- Araki, K.; Nagata, K. Protein folding and quality control in the ER. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 3, n. 11, p. a007526, 2011.
- Arruda, A. P.; Hotamisligil, G. S. Calcium homeostasis and organelle function in the pathogenesis of obesity and diabetes. **Cell metabolism**, 22, n. 3, p. 381-397, 2015.
- Averill-Bates, D. A.; Chérif, A.; Agostinelli, E. *et al.* Anti-tumoral effect of native and immobilized bovine serum amine oxidase in a mouse melanoma model. **Biochemical pharmacology**, 69, n. 12, p. 1693-1704, 2005.
- Bacchi, C.; Yarlett, N. Polyamine metabolism as chemotherapeutic target in protozoan parasites. **Mini reviews in medicinal chemistry**, 2, n. 6, p. 553-563, 2002.
- Baek, A. R.; Hong, J.; Song, K. S. *et al.* Spermidine attenuates bleomycin-induced lung fibrosis by inducing autophagy and inhibiting endoplasmic reticulum stress (ERS)-induced cell death in mice. **Experimental & Molecular Medicine**, 52, n. 12, p. 2034-2045, 2020.

Balakumar, M.; Raji, L.; Prabhu, D. *et al.* High-fructose diet is as detrimental as high-fat diet in the induction of insulin resistance and diabetes mediated by hepatic/pancreatic endoplasmic reticulum (ER) stress. **Molecular and cellular biochemistry**, 423, p. 93-104, 2016.

Banerjee, P.; Eckert, A. O.; Schrey, A. K. *et al.* ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic acids research**, 46, n. W1, p. W257-W263, 2018.

Barreto, C. V. Q.; Vieira, A. G.; Nogueira, E. R. *et al.* Diabetes Mellitus Tipo 2: principais aspectos. **Revista Coopex**, 15, n. 02, p. 5397-5406, 2024.

Bergman, R. N.; Piccinini, F.; Kabir, M. *et al.* Hypothesis: role of reduced hepatic insulin clearance in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes**, 68, n. 9, p. 1709-1716, 2019.

Berra-Romani, R.; Guzmán-Silva, A.; Vargaz-Guadarrama, A. *et al.* Type 2 diabetes alters intracellular Ca²⁺ handling in native endothelium of excised rat aorta. **International Journal of Molecular Sciences**, 21, n. 1, p. 250, 2019.

Bhukel, A.; Madeo, F.; Sigrist, S. J. Spermidine boosts autophagy to protect from synapse aging. **Autophagy**, 13, n. 2, p. 444-445, 2017.

Boland, B. B.; Rhodes, C. J.; Grimsby, J. S. The dynamic plasticity of insulin production in β -cells. **Molecular metabolism**, 6, n. 9, p. 958-973, 2017.

Bravo, R.; Parra, V.; Gatica, D. *et al.* Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. **International review of cell and molecular biology**, 301, p. 215-290, 2013.

Bray, G. A. Fructose: pure, white, and deadly? Fructose, by any other name, is a health hazard. **Journal of diabetes science and technology**, 4, n. 4, p. 1003-1007, 2010.

Bray, G. A.; Nielsen, S. J.; Popkin, B. M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. **The American journal of clinical nutrition**, 79, n. 4, p. 537-543, 2004.

Brozzi, F.; Nardelli, T. R.; Lopes, M. *et al.* Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms. **Diabetologia**, 58, p. 2307-2316, 2015.

Bunney, P.; Zink, A.; Holm, A. *et al.* Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet. **Physiology & behavior**, 176, p. 139-148, 2017.

Cai, G.; Sobieszczuk-Nowicka, E.; Aloisi, I. *et al.* Polyamines are common players in different facets of plant programmed cell death. **Amino Acids**, 47, p. 27-44, 2015.

Cai, J.; Sun, Z.; Zhang, L. *et al.* SERP1 reduces inchoate acute hepatic injury through regulation of endoplasmic reticulum stress via the GSK3 β / β -catenin/TCF/LEF signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, 25, n. 6, p. 1-9, 2022.

Cao, J.; Dai, D.-L.; Yao, L. *et al.* Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. **Molecular and cellular biochemistry**, 364, p. 115-129, 2012.

Casero Jr, R. A.; Marton, L. J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. **Nature reviews Drug discovery**, 6, n. 5, p. 373-390, 2007.

Chang, A. S.; Hathaway, C. K.; Smithies, O. *et al.* Transforming growth factor- β 1 and diabetic nephropathy. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, 310, n. 8, p. F689-F696, 2016.

Chang, Y.; Lau, W. L.; Jo, H. *et al.* Pharmacologic blockade of α v β 1 integrin ameliorates renal failure and fibrosis in vivo. **Journal of the American Society of Nephrology**, 28, n. 7, p. 1998-2005, 2017.

Chen, D.; Dixon, B. J.; Doycheva, D. M. *et al.* IRE1 α inhibition decreased TXNIP/NLRP3 inflammasome activation through miR-17-5p after neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. **Journal of neuroinflammation**, 15, p. 1-18, 2018.

Chen, J.; Zhang, M.; Zhu, M. *et al.* Paeoniflorin prevents endoplasmic reticulum stress-associated inflammation in lipopolysaccharide-stimulated human umbilical vein endothelial cells via the IRE1 α /NF- κ B signaling pathway. **Food & function**, 9, n. 4, p. 2386-2397, 2018.

Chen, Q.; Zhao, X.; Xu, Z. *et al.* Endoplasmic reticulum stress mechanisms and exercise intervention in type 2 diabetes mellitus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 177, p. 117122, 2024.

Chen, W.; Zhang, L.; Zhang, K. *et al.* Reciprocal regulation of autophagy and dNTP pools in human cancer cells. **Autophagy**, 10, n. 7, p. 1272-1284, 2014.

Cherrington, A.; Moore, M.; Sindelar, D. *et al.* Insulin action on the liver in vivo. **Biochemical Society Transactions**, 35, n. 5, p. 1171-1174, 2007.

Choksomngam, Y.; Pattanakuhar, S.; Chattipakorn, N. *et al.* The metabolic role of spermidine in obesity: evidence from cells to community. **Obesity Research & Clinical Practice**, 15, n. 4, p. 315-326, 2021.

Christensen, A. A.; Gannon, M. The beta cell in type 2 diabetes. **Current diabetes reports**, 19, p. 1-8, 2019.

Coca, S. G.; Ismail-Beigi, F.; Haq, N. *et al.* Role of intensive glucose control in development of renal end points in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. **Archives of internal medicine**, 172, n. 10, p. 761-769, 2012.

Coelho, M.; Oliveira, T.; Fernandes, R. State of the art paper Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Archives of medical science**, 9, n. 2, p. 191-200, 2013.

Correia, A.; Monteiro, A.; Silva, R. *et al.* Lipid nanoparticles strategies to modify pharmacokinetics of central nervous system targeting drugs: Crossing or circumventing the

blood–brain barrier (BBB) to manage neurological disorders. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 189, p. 114485, 2022.

Coskun, Z. M. ER stress amelioration by saxagliptin protects the liver against fructose-induced insulin resistance. **Archives of Medical Research**, 51, n. 4, p. 303-309, 2020.

Costa-Mattioli, M.; Gobert, D.; Harding, H. *et al.* Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2 α kinase GCN2. **Nature**, 436, n. 7054, p. 1166-1170, 2005.

Cotter, T. G.; Rinella, M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: the state of the disease. **Gastroenterology**, 158, n. 7, p. 1851-1864, 2020.

Czech, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nature medicine**, 23, n. 7, p. 804-814, 2017.

Czech, M. P. Mechanisms of insulin resistance related to white, beige, and brown adipocytes. **Molecular metabolism**, 34, p. 27-42, 2020.

Daina, A.; Michelin, O.; Zoete, V. Swiss ADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* 7 (1–12): 42717. 2017.

Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, 7, n. 1, p. 42717, 2017.

Dali-Youcef, N.; Mecili, M.; Ricci, R. *et al.* Metabolic inflammation: connecting obesity and insulin resistance. **Annals of medicine**, 45, n. 3, p. 242-253, 2013.

Del Rio, B.; Redruello, B.; Linares, D. M. *et al.* Spermine and spermidine are cytotoxic towards intestinal cell cultures, but are they a health hazard at concentrations found in foods? **Food Chemistry**, 269, p. 321-326, 2018.

Demir, S.; Nawroth, P. P.; Herzig, S. *et al.* Emerging targets in type 2 diabetes and diabetic complications. **Advanced Science**, 8, n. 18, p. 2100275, 2021.

Deng, K.; He, H.; Qiu, J. *et al.* Increased synthesis of spermidine as a result of upregulation of arginase I promotes axonal regeneration in culture and in vivo. **Journal of Neuroscience**, 29, n. 30, p. 9545-9552, 2009.

Domingues, A.; Jolibois, J.; Marquet De Rougé, P. *et al.* The emerging role of TXNIP in ischemic and cardiovascular diseases; a novel marker and therapeutic target. **International Journal of Molecular Sciences**, 22, n. 4, p. 1693, 2021.

Egan, W. J.; Merz, K. M.; Baldwin, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. **Journal of medicinal chemistry**, 43, n. 21, p. 3867-3877, 2000.

Einarson, T. R.; Acs, A.; Ludwig, C. *et al.* Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007–2017. **Cardiovascular diabetology**, 17, p. 1-19, 2018.

Eisenberg, T.; Abdellatif, M.; Schroeder, S. *et al.* Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. **Nature medicine**, 22, n. 12, p. 1428-1438, 2016.

Eisenberg, T.; Abdellatif, M.; Zimmermann, A. *et al.* Dietary spermidine for lowering high blood pressure. **Autophagy**, 13, n. 4, p. 767-769, 2017.

Eisenberg, T.; Knauer, H.; Schauer, A. *et al.* Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. **Nature cell biology**, 11, n. 11, p. 1305-1314, 2009.

Eizirik, D. L.; Pasquali, L.; Cnop, M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. **Nature Reviews Endocrinology**, 16, n. 7, p. 349-362, 2020.

El-Kashef, D. H.; Sewilam, H. M. Empagliflozin mitigates methotrexate-induced hepatotoxicity: Targeting ASK-1/JNK/Caspase-3 pathway. **International Immunopharmacology**, 114, p. 109494, 2023.

Elmeliegy, M.; Vourvahis, M.; Guo, C. *et al.* Effect of P-glycoprotein (P-gp) inducers on exposure of P-gp substrates: review of clinical drug–drug interaction studies. **Clinical pharmacokinetics**, 59, p. 699-714, 2020.

Engin, F.; Nguyen, T.; Yermalovich, A. *et al.* Aberrant islet unfolded protein response in type 2 diabetes. **Scientific reports**, 4, n. 1, p. 4054, 2014.

Engin, F.; Yermalovich, A.; Nguyen, T. *et al.* Restoration of the unfolded protein response in pancreatic β cells protects mice against type 1 diabetes. **Science translational medicine**, 5, n. 211, p. 211ra156-211ra156, 2013.

Enooku, K.; Kondo, M.; Fujiwara, N. *et al.* Hepatic IRS1 and β -catenin expression is associated with histological progression and overt diabetes emergence in NAFLD patients. **Journal of gastroenterology**, 53, p. 1261-1275, 2018.

Esposito, K.; Kastorini, C.-M.; Panagiotakos, D. B. *et al.* Prevention of type 2 diabetes by dietary patterns: a systematic review of prospective studies and meta-analysis. **Metabolic syndrome and related disorders**, 8, n. 6, p. 471-476, 2010.

Falkevall, A.; Mehlem, A.; Palombo, I. *et al.* Reducing VEGF-B signaling ameliorates renal lipotoxicity and protects against diabetic kidney disease. **Cell Metabolism**, 25, n. 3, p. 713-726, 2017.

Faul, F.; Erdfelder, E.; Lang, A.-G. *et al.* G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior research methods**, 39, n. 2, p. 175-191, 2007.

Fernández, Á. F.; Bárcena, C.; Martínez-García, G. G. *et al.* Autophagy counteracts weight gain, lipotoxicity and pancreatic β -cell death upon hypercaloric pro-diabetic regimens. **Cell death & disease**, 8, n. 8, p. e2970-e2970, 2017.

Ferre, P.; Foufelle, F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. **Diabetes, obesity and metabolism**, 12, p. 83-92, 2010.

Filfan, M.; Olaru, A.; Udristoiu, I. *et al.* Long-term treatment with spermidine increases health span of middle-aged Sprague-Dawley male rats. **Geroscience**, 42, p. 937-949, 2020.

Firpo, M. R.; Mounce, B. C. Diverse functions of polyamines in virus infection. **Biomolecules**, 10, n. 4, p. 628, 2020.

Flecknell, P. **Laboratory animal anaesthesia**. Academic press, 2015. 0128005785.

Flessa, C. M.; Kyrou, I.; Nasiri-Ansari, N. *et al.* Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic (metabolic associated) fatty liver disease (NAFLD/MAFLD). **Journal of Cellular Biochemistry**, 123, n. 10, p. 1585-1606, 2022.

Flister, K. F. T.; Pinto, B. A. S.; França, L. M. *et al.* Long-term exposure to high-sucrose diet down-regulates hepatic endoplasmic reticulum-stress adaptive pathways and potentiates de novo lipogenesis in weaned male mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 62, p. 155-166, 2018.

Flynn, A. T.; Hogarty, M. D. Myc, oncogenic protein translation, and the role of polyamines. **Medical Sciences**, 6, n. 2, p. 41, 2018.

França, L. M.; Dos Santos, P. C.; Barroso, W. A. *et al.* Post-weaning exposure to high-sucrose diet induces early non-alcoholic fatty liver disease onset and progression in male mice: role of dysfunctional white adipose tissue. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, 11, n. 5, p. 509-520, 2020.

Freedman, B. D.; Lee, E.-J.; Park, Y. *et al.* A dominant negative peroxisome proliferator-activated receptor- γ knock-in mouse exhibits features of the metabolic syndrome. **Journal of Biological Chemistry**, 280, n. 17, p. 17118-17125, 2005.

Fu, S.; Yang, L.; Li, P. *et al.* Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. **Nature**, 473, n. 7348, p. 528-531, 2011.

Fu, Z.; R Gilbert, E.; Liu, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Current diabetes reviews**, 9, n. 1, p. 25-53, 2013.

Fung, T. S.; Huang, M.; Liu, D. X. Coronavirus-induced ER stress response and its involvement in regulation of coronavirus–host interactions. **Virus research**, 194, p. 110-123, 2014.

Galicia-Garcia, U.; Benito-Vicente, A.; Jebari, S. *et al.* Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. **International journal of molecular sciences**, 21, n. 17, p. 6275, 2020.

Gambino, R.; Bugianesi, E.; Rosso, C. *et al.* Different serum free fatty acid profiles in NAFLD subjects and healthy controls after oral fat load. **International journal of molecular sciences**, 17, n. 4, p. 479, 2016.

Gao, M.; Zhao, W.; Li, C. *et al.* Spermidine ameliorates non-alcoholic fatty liver disease through regulating lipid metabolism via AMPK. **Biochemical and biophysical research communications**, 505, n. 1, p. 93-98, 2018.

García-Prat, L.; Martínez-Vicente, M.; Perdiguerro, E. *et al.* Autophagy maintains stemness by preventing senescence. **Nature**, 529, n. 7584, p. 37-42, 2016.

Gardner, B. M.; Walter, P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. **Science**, 333, n. 6051, p. 1891-1894, 2011.

Gast, K. B.; Tjeerdema, N.; Stijnen, T. *et al.* Insulin resistance and risk of incident cardiovascular events in adults without diabetes: meta-analysis. **PloS one**, 7, n. 12, p. e52036, 2012.

Gastaldelli, A.; Gaggini, M.; DeFronzo, R. A. Role of adipose tissue insulin resistance in the natural history of type 2 diabetes: results from the San Antonio Metabolism Study. **Diabetes**, 66, n. 4, p. 815-822, 2017.

Genuth, S. M.; Palmer, J. P.; Nathan, D. M. Classification and diagnosis of diabetes. 2021.

Gerner, E. W.; Meyskens Jr, F. L. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. **Nature Reviews Cancer**, 4, n. 10, p. 781-792, 2004.

Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **Journal of combinatorial chemistry**, 1, n. 1, p. 55-68, 1999.

Gibson, S.; Gunn, P.; Wittekind, A. *et al.* The effects of sucrose on metabolic health: a systematic review of human intervention studies in healthy adults. **Critical reviews in food science and nutrition**, 53, n. 6, p. 591-614, 2013.

Graciano, M. F.; Valle, M.; Kowluru, A. *et al.* Regulation of insulin secretion and reactive oxygen species production by free fatty acids in pancreatic islets. **Islets**, 3, n. 5, p. 213-223, 2011.

Greenwood, D.; Threapleton, D.; Evans, C. *et al.* Association between sugar-sweetened and artificially sweetened soft drinks and type 2 diabetes: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. **British Journal of Nutrition**, 112, n. 5, p. 725-734, 2014.

Gupta, V. K.; Pech, U.; Bhukel, A. *et al.* Spermidine suppresses age-associated memory impairment by preventing adverse increase of presynaptic active zone size and release. **PLoS biology**, 14, n. 9, p. e1002563, 2016.

Gupta, V. K.; Scheunemann, L.; Eisenberg, T. *et al.* Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autophagy-dependent manner. **Nature neuroscience**, 16, n. 10, p. 1453-1460, 2013.

Halban, P.; Polonsky, K.; Bowden, D. *et al.* beta-cell failure in 1251 type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. **Diabetes Care**, 1252, n. 2014, p. 37, 1751.

Halban, P. A. Proinsulin processing in the regulated and the constitutive secretory pathway. **Diabetologia**, 37, p. S65-S72, 1994.

Han, J.; Murthy, R.; Wood, B. *et al.* ER stress signalling through eIF2 α and CHOP, but not IRE1 α , attenuates adipogenesis in mice. **Diabetologia**, 56, p. 911-924, 2013.

Handa, A. K.; Fatima, T.; Mattoo, A. K. Polyamines: bio-molecules with diverse functions in plant and human health and disease. **Frontiers in chemistry**, 6, p. 10, 2018.

Hansen, M.; Rubinsztein, D. C.; Walker, D. W. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. **Nature reviews Molecular cell biology**, 19, n. 9, p. 579-593, 2018.

Harding, H. P.; Novoa, I.; Zhang, Y. *et al.* Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Molecular cell**, 6, n. 5, p. 1099-1108, 2000.

Harding, H. P.; Zeng, H.; Zhang, Y. *et al.* Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk $^{-/-}$ mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. **Molecular cell**, 7, n. 6, p. 1153-1163, 2001.

Hasnain, S. Z.; Borg, D. J.; Harcourt, B. E. *et al.* Glycemic control in diabetes is restored by therapeutic manipulation of cytokines that regulate beta cell stress. **Nature medicine**, 20, n. 12, p. 1417-1426, 2014.

Hayashi, A.; Kasahara, T.; Iwamoto, K. *et al.* The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced XBP1 splicing during brain development. **Journal of Biological Chemistry**, 282, n. 47, p. 34525-34534, 2007.

He, Y.; Sun, S.; Sha, H. *et al.* Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor. **Gene expression**, 15, n. 1, p. 13, 2010.

Hebert, D. N.; Molinari, M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. **Physiological reviews**, 87, n. 4, p. 1377-1408, 2007.

Herrema, H.; Zhou, Y.; Zhang, D. *et al.* XBP1s is an anti-lipogenic protein. **Journal of Biological Chemistry**, 291, n. 33, p. 17394-17404, 2016.

Hesterberg, R. S.; Cleveland, J. L.; Epling-Burnette, P. K. Role of polyamines in immune cell functions. **Medical sciences**, 6, n. 1, p. 22, 2018.

Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nature reviews Molecular cell biology**, 13, n. 2, p. 89-102, 2012.

Hetz, C.; Mollereau, B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Neuroscience**, 15, n. 4, p. 233-249, 2014.

Hetz, C.; Zhang, K.; Kaufman, R. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. **Nature reviews Molecular cell biology**, 21, n. 8, p. 421-438, 2020.

Hoang Do, O.; Thorn, P. Insulin secretion from beta cells within intact islets: location matters. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 42, n. 4, p. 406-414, 2015.

Hollien, J. Evolution of the unfolded protein response. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, 1833, n. 11, p. 2458-2463, 2013.

Hong, S.-h.; Choi, K. M. Sarcopenic obesity, insulin resistance, and their implications in cardiovascular and metabolic consequences. **International journal of molecular sciences**, 21, n. 2, p. 494, 2020.

Huang, C.-C.; Yang, C.-Y.; Su, C.-C. *et al.* 4-Methyl-2, 4-bis (4-hydroxyphenyl) pent-1-ene, a major active metabolite of bisphenol A, triggers pancreatic β -cell death via a JNK/AMPK α activation-regulated endoplasmic reticulum stress-mediated apoptotic pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, 22, n. 9, p. 4379, 2021.

Huang, J.-F.; Tsai, P.-C.; Yeh, M.-L. *et al.* Risk stratification of non-alcoholic fatty liver disease across body mass index in a community basis. **Journal of the Formosan Medical Association**, 119, n. 1, p. 89-96, 2020.

Huang, J.; Zhang, H.; Zhang, J. *et al.* Spermidine exhibits protective effects against traumatic brain injury. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 40, p. 927-937, 2020.

Huh, W. J.; Esen, E.; Geahlen, J. H. *et al.* XBP1 controls maturation of gastric zymogenic cells by induction of MIST1 and expansion of the rough endoplasmic reticulum. **Gastroenterology**, 139, n. 6, p. 2038-2049, 2010.

Hummasti, S.; Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. **Circulation research**, 107, n. 5, p. 579-591, 2010.

Hydes, T.; Alam, U.; Cuthbertson, D. J. The impact of macronutrient intake on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): too much fat, too much carbohydrate, or just too many calories? **Frontiers in nutrition**, 8, p. 42, 2021.

Hyslop, P.; York, D.; Corina, D. Changes in the composition and fluidity of membranes in obese (ob/ob) mice: a study of hepatic microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase activity. **International journal of obesity**, 6, n. 3, p. 279-289, 1982.

Imai, Y.; Soda, M.; Hatakeyama, S. *et al.* CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. **Molecular cell**, 10, n. 1, p. 55-67, 2002.

Iurlaro, R.; Muñoz-Pinedo, C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. **The FEBS journal**, 283, n. 14, p. 2640-2652, 2016.

Iwakoshi, N. N.; Lee, A.-H.; Vallabhajosyula, P. *et al.* Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. **Nature immunology**, 4, n. 4, p. 321-329, 2003.

Jain, V. Role of polyamines in asthma pathophysiology. **Medical Sciences**, 6, n. 1, p. 4, 2018.

Jell, J.; Merali, S.; Hensen, M. L. *et al.* Genetically altered expression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase affects fat metabolism in mice via acetyl-CoA. **Journal of Biological Chemistry**, 282, n. 11, p. 8404-8413, 2007.

Jin, W.; Fan, M.; Zhang, Y. *et al.* Polydatin prevents lipotoxicity-induced dysfunction in pancreatic β -cells by inhibiting endoplasmic reticulum stress and excessive autophagy. **Phytomedicine**, 106, p. 154410, 2022.

Jo, H.; Choe, S. S.; Shin, K. C. *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces hepatic steatosis via increased expression of the hepatic very low-density lipoprotein receptor. **Hepatology**, 57, n. 4, p. 1366-1377, 2013.

Jocken, J. W.; Blaak, E. E. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. **Physiology & behavior**, 94, n. 2, p. 219-230, 2008.

Kammoun, H. L.; Chabanon, H.; Hainault, I. *et al.* GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. **The Journal of clinical investigation**, 119, n. 5, p. 1201-1215, 2009.

Keohane, P.; Everett, J. R.; Pereira, R. *et al.* Supplementation of spermidine at 40 mg/day has minimal effects on circulating polyamines: an exploratory double-blind randomized controlled trial in older men. **Nutrition Research**, 2024.

Khalid, M.; Petroianu, G.; Adem, A. Advanced glycation end products and diabetes mellitus: mechanisms and perspectives. **Biomolecules**, 12, n. 4, p. 542, 2022.

Kiechl, S.; Pechlaner, R.; Willeit, P. *et al.* Higher spermidine intake is linked to lower mortality: a prospective population-based study. **The American journal of clinical nutrition**, 108, n. 2, p. 371-380, 2018.

Kilanowska, A.; Ziółkowska, A. Apoptosis in type 2 diabetes: Can it be prevented? Hippo pathway prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, 23, n. 2, p. 636, 2022.

Kim, H.-J.; Kim, J. H.; Noh, S. *et al.* Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. **Journal of proteome research**, 10, n. 2, p. 722-731, 2011.

Kimball, S. R.; Jefferson, L. S. Induction of REDD1 gene expression in the liver in response to endoplasmic reticulum stress is mediated through a PERK, eIF2 α phosphorylation, ATF4-dependent cascade. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 427, n. 3, p. 485-489, 2012.

Kleiner, D. E.; Brunt, E. M.; Van Natta, M. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005.

Kopf, S.; Groener, J. B.; Kender, Z. *et al.* Breathlessness and restrictive lung disease: an important diabetes-related feature in patients with type 2 diabetes. **Respiration**, 96, n. 1, p. 29-40, 2018.

Kopf, S.; Nawroth, P. P. Diabetic pulmopathy: a new clinical challenge for diabetology. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, 126, n. 09, p. 590-591, 2018.

Krausová, P.; Kalač, P.; Křížek, M. *et al.* Content of biologically active polyamines in livers of cattle, pigs and chickens after animal slaughter. **Meat science**, 73, n. 4, p. 640-644, 2006.

- Kulkarni, A.; Anderson, C. M.; Mirmira, R. G. *et al.* Role of polyamines and hypusine in β cells and diabetes pathogenesis. **Metabolites**, 12, n. 4, p. 344, 2022.
- Kulkarni, A.; Muralidharan, C.; May, S. C. *et al.* Inside the β cell: molecular stress response pathways in diabetes pathogenesis. **Endocrinology**, 164, n. 1, p. bqac184, 2023.
- Kumar, K. H. The good, the bad, and the ugly facets of insulin resistance. **medical journal armed forces india**, 76, n. 1, p. 4-7, 2020.
- Kumar, V.; Agrawal, R.; Pandey, A. *et al.* Compromised DNA repair is responsible for diabetes-associated fibrosis. **The EMBO journal**, 39, n. 11, p. e103477, 2020.
- Kumar, V.; Fleming, T.; Terjung, S. *et al.* Homeostatic nuclear RAGE–ATM interaction is essential for efficient DNA repair. **Nucleic acids research**, 45, n. 18, p. 10595-10613, 2017.
- Ladenburg, A.; Abel, J. Ueber das aethylenimin (Spermin?). **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, 21, n. 1, p. 758-766, 1888.
- Lagunin, A.; Zakharov, A.; Filimonov, D. *et al.* QSAR modelling of rat acute toxicity on the basis of PASS prediction. **Molecular informatics**, 30, n. 2-3, p. 241-250, 2011.
- Lamming, D. W.; Ye, L.; Katajisto, P. *et al.* Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. **science**, 335, n. 6076, p. 1638-1643, 2012.
- Leclercq, I. A.; Morais, A. D. S.; Schroyen, B. *et al.* Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. **Journal of hepatology**, 47, n. 1, p. 142-156, 2007.
- Lee, A.-H.; Heidtman, K.; Hotamisligil, G. S. *et al.* Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1 α and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108, n. 21, p. 8885-8890, 2011.
- Lee, A.-H.; Iwakoshi, N. N.; Glimcher, L. H. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. **Molecular and cellular biology**, 23, n. 21, p. 7448-7459, 2003.
- Lee, A. H.; Chu, G. C.; Iwakoshi, N. N. *et al.* XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. **The EMBO journal**, 24, n. 24, p. 4368-4380, 2005.
- Lee, H. J.; Seo, H. I.; Cha, H. Y. *et al.* Diabetes and Alzheimer's disease: mechanisms and nutritional aspects. **Clinical nutrition research**, 7, n. 4, p. 229-240, 2018.
- Lee, J.-S.; Mendez, R.; Heng, H. H. *et al.* Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. **American journal of translational research**, 4, n. 1, p. 102, 2012.
- Lee, S.-H.; Park, S.-Y.; Choi, C. S. Insulin resistance: from mechanisms to therapeutic strategies. **Diabetes & metabolism journal**, 46, n. 1, p. 15-37, 2022.

Lei, K.; Davis, R. J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100, n. 5, p. 2432-2437, 2003.

Lenis, Y. Y.; Elmetwally, M. A.; Maldonado-Estrada, J. G. *et al.* Physiological importance of polyamines. **Zygote**, 25, n. 3, p. 244-255, 2017.

Lerner, A. G.; Upton, J.-P.; Praveen, P. *et al.* IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. **Cell metabolism**, 16, n. 2, p. 250-264, 2012.

Levine, B.; Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, 132, n. 1, p. 27-42, 2008.

Levine, B.; Kroemer, G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective. **Cell**, 176, n. 1, p. 11-42, 2019.

Li, D.; Zhang, S.; Yang, C. *et al.* A novel PTP1B inhibitor-phosphate of polymannuronic acid ameliorates insulin resistance by regulating IRS-1/Akt signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, 22, n. 23, p. 12693, 2021.

Li, L.; Zeng, X.; Liu, Z. *et al.* Mesenchymal stromal cells protect hepatocytes from lipotoxicity through alleviation of endoplasmic reticulum stress by restoring SERCA activity. **Journal of cellular and molecular medicine**, 25, n. 6, p. 2976-2993, 2021.

Li, R.; Guo, Z. The role of podocyte autophagy and endoplasmic reticulum stress in diabetic kidney disease. **Zhonghua wei Zhong Bing ji jiu yi xue**, 34, n. 2, p. 221-224, 2022.

Li, W.; Cao, T.; Luo, C. *et al.* Crosstalk between ER stress, NLRP3 inflammasome, and inflammation. **Applied microbiology and biotechnology**, 104, p. 6129-6140, 2020.

Liang, H.; Pan, Y.; Teng, Y. *et al.* A proteoglycan extract from *Ganoderma Lucidum* protects pancreatic beta-cells against STZ-induced apoptosis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 84, n. 12, p. 2491-2498, 2020.

Liao, C.-Y.; Kummert, O. M.; Bair, A. M. *et al.* The autophagy inducer spermidine protects against metabolic dysfunction during overnutrition. **The Journals of Gerontology: Series A**, 76, n. 10, p. 1714-1725, 2021.

Liao, Z.-Z.; Deng, Q.; Xiao, F. *et al.* Spermidine inhibits high glucose-induced endoplasmic reticulum stress in HT22 cells by upregulation of growth differentiation factor 11. **Neuroreport**, 33, n. 18, p. 819-827, 2022.

Lin, J. H.; Li, H.; Zhang, Y. *et al.* Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. **PloS one**, 4, n. 1, p. e4170, 2009.

Lin, Y.; Xu, Y.; Zheng, X. *et al.* Astragaloside IV ameliorates Streptozotocin induced pancreatic β -cell apoptosis and dysfunction through SIRT1/P53 and Akt/GSK3 β /Nrf2 signaling pathways. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, p. 131-140, 2022.

Lipinski, C. a, Lombardo, F., Dominy, BW & Feeney, PJ Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 46, n. 3, p. 00129-00120, 2001.

Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, 64, p. 4-17, 2012.

Lipson, K. L.; Fonseca, S. G.; Ishigaki, S. *et al.* Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. **Cell metabolism**, 4, n. 3, p. 245-254, 2006.

Liu, M.; Weiss, M. A.; Arunagiri, A. *et al.* Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, 20, p. 28-50, 2018.

Liu, R.; Li, X.; Ma, H. *et al.* Spermidine endows macrophages anti-inflammatory properties by inducing mitochondrial superoxide-dependent AMPK activation, Hif-1 α upregulation and autophagy. **Free Radical Biology and Medicine**, 161, p. 339-350, 2020.

Lobo, S. Is there enough focus on lipophilicity in drug discovery? **Expert opinion on drug discovery**, 15, n. 3, p. 261-263, 2020.

Lu, Z.; Miao, Y.; Muhammad, I. *et al.* Colistin-induced autophagy and apoptosis involves the JNK-Bcl2-Bax signaling pathway and JNK-p53-ROS positive feedback loop in PC-12 cells. **Chemico-biological interactions**, 277, p. 62-73, 2017.

Luo, J.; Jin, W.; Jin, M. *et al.* Jiedutongluotiaogan formula restores pancreatic function by suppressing excessive autophagy and endoplasmic reticulum stress. **Pharmaceutical Biology**, 60, n. 1, p. 1542-1555, 2022.

Lv, C.; Sun, Y.; Zhang, Z. Y. *et al.* β -cell dynamics in type 2 diabetes and in dietary and exercise interventions. **Journal of Molecular Cell Biology**, 14, n. 7, p. mjac046, 2022.

Ma, L.; Ni, L.; Yang, T. *et al.* Preventive and therapeutic spermidine treatment attenuates acute colitis in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 69, n. 6, p. 1864-1876, 2021.

Ma, L.; Ni, Y.; Hu, L. *et al.* Spermidine ameliorates high-fat diet-induced hepatic steatosis and adipose tissue inflammation in preexisting obese mice. **Life Sciences**, 265, p. 118739, 2021.

Ma, L.; Ni, Y.; Wang, Z. *et al.* Spermidine improves gut barrier integrity and gut microbiota function in diet-induced obese mice. **Gut microbes**, 12, n. 1, p. 1832857, 2020.

Maamoun, H.; Abdelsalam, S. S.; Zeidan, A. *et al.* Endoplasmic reticulum stress: a critical molecular driver of endothelial dysfunction and cardiovascular disturbances associated with diabetes. **International journal of molecular sciences**, 20, n. 7, p. 1658, 2019.

Macaulay, K.; Woodgett, J. R. Targeting glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in the treatment of Type 2 diabetes. **Expert opinion on therapeutic targets**, 12, n. 10, p. 1265-1274, 2008.

Macheras, P.; Chrysafidis, P. Revising pharmacokinetics of oral drug absorption: I models based on biopharmaceutical/physiological and finite absorption time concepts. **Pharmaceutical research**, 37, p. 1-13, 2020.

Madeo, F.; Eisenberg, T.; Pietrocola, F. *et al.* Spermidine in health and disease. **Science**, 359, n. 6374, p. ean2788, 2018.

Madeo, F.; Hofer, S. J.; Pendl, T. *et al.* Nutritional aspects of spermidine. **Annual review of nutrition**, 40, n. 1, p. 135-159, 2020a.

Madeo, F.; Hofer, S. J.; Pendl, T. *et al.* Nutritional aspects of spermidine. **Annual review of nutrition**, 40, p. 135-159, 2020b.

Madhavan, A.; Kok, B. P.; Rius, B. *et al.* Pharmacologic IRE1/XBP1s activation promotes systemic adaptive remodeling in obesity. **Nature communications**, 13, n. 1, p. 608, 2022.

Malik, V. S.; Popkin, B. M.; Bray, G. A. *et al.* Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. **Diabetes care**, 33, n. 11, p. 2477-2483, 2010.

Marciniak, S. J.; Yun, C. Y.; Oyadomari, S. *et al.* CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. **Genes & development**, 18, n. 24, p. 3066-3077, 2004.

Martinon, F.; Chen, X.; Lee, A.-H. *et al.* TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. **Nature immunology**, 11, n. 5, p. 411-418, 2010.

Massaro, C.; Thomas, J.; Phanstiel Iv, O. Investigation of polyamine metabolism and homeostasis in pancreatic cancers. **Medical Sciences**, 5, n. 4, p. 32, 2017.

Mathews, M. B.; Hershey, J. W. The translation factor eIF5A and human cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, 1849, n. 7, p. 836-844, 2015.

Mccullough, K. D.; Martindale, J. L.; Klotz, L.-O. *et al.* Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. **Molecular and cellular biology**, 2001.

Méndez, J. D.; Balderas, F. L. Inhibition by L-arginine and spermidine of hemoglobin glycation and lipid peroxidation in rats with induced diabetes. **Biomedicine & pharmacotherapy**, 60, n. 1, p. 26-31, 2006.

Miao, H.; Ou, J.; Peng, Y. *et al.* Macrophage ABHD5 promotes colorectal cancer growth by suppressing spermidine production by SRM. **Nature communications**, 7, n. 1, p. 11716, 2016.

Michiels, C. F.; Kurdi, A.; Timmermans, J.-P. *et al.* Spermidine reduces lipid accumulation and necrotic core formation in atherosclerotic plaques via induction of autophagy. **Atherosclerosis**, 251, p. 319-327, 2016.

Minois, N. Molecular basis of the 'anti-aging' effect of spermidine and other natural polyamines-a mini-review. **Gerontology**, 60, n. 4, p. 319-326, 2014.

Mis, N. F.; Braegger, C.; Bronsky, J. *et al.* Sugar in infants, children and adolescents: a position paper of the European society for paediatric gastroenterology, hepatology and nutrition committee on nutrition. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, 65, n. 6, p. 681-696, 2017.

Moinard, C.; Cynober, L.; De Bandt, J.-P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, 24, n. 2, p. 184-197, 2005.

Moore, J. A.; Miller, W. P.; Dennis, M. D. Glucosamine induces REDD1 to suppress insulin action in retinal Müller cells. **Cellular signalling**, 28, n. 5, p. 384-390, 2016.

Muegge, I.; Heald, S. L.; Brittelli, D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. **Journal of medicinal chemistry**, 44, n. 12, p. 1841-1846, 2001.

Mulyani, W. R. W.; Sanjiwani, M. I. D.; Sandra *et al.* Chaperone-based therapeutic target innovation: Heat shock protein 70 (HSP70) for Type 2 diabetes mellitus. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**, p. 559-568, 2020.

Mustapha, S.; Mohammed, M.; Azemi, A. K. *et al.* Current status of endoplasmic reticulum stress in type II diabetes. **Molecules**, 26, n. 14, p. 4362, 2021.

Nam, Y. H.; Brensinger, C. M.; Bilker, W. B. *et al.* Association between serious hypoglycemia and calcium-channel blockers used concomitantly with insulin secretagogues. **JAMA Network Open**, 4, n. 9, p. e2124443-e2124443, 2021.

Nguyen-Vo, T.-H.; Trinh, Q. H.; Nguyen, L. *et al.* iCYP-MFE: Identifying human cytochrome P450 inhibitors using multitask learning and molecular fingerprint-embedded encoding. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 62, n. 21, p. 5059-5068, 2021.

Nguyen, T.; Nioi, P.; Pickett, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **Journal of biological chemistry**, 284, n. 20, p. 13291-13295, 2009.

Ni, Y.; Hu, Y.; Lou, X. *et al.* Spermidine ameliorates nonalcoholic steatohepatitis through thyroid hormone-responsive protein signaling and the gut microbiota-mediated metabolism of bile acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 70, n. 21, p. 6478-6492, 2022.

Nichols, W. C.; Seligsohn, U.; Zivelin, A. *et al.* Mutations in the ER–Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. **Cell**, 93, n. 1, p. 61-70, 1998.

Ning, J.; Hong, T.; Ward, A. *et al.* Constitutive role for IRE1 α -XBP1 signaling pathway in the insulin-mediated hepatic lipogenic program. **Endocrinology**, 152, n. 6, p. 2247-2255, 2011.

Nishimura, K.; Shiina, R.; Kashiwagi, K. *et al.* Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. **Journal of biochemistry**, 139, n. 1, p. 81-90, 2006.

Noro, T.; Namekata, K.; Kimura, A. *et al.* Spermidine promotes retinal ganglion cell survival and optic nerve regeneration in adult mice following optic nerve injury. **Cell death & disease**, 6, n. 4, p. e1720-e1720, 2015.

Nussey, S. S.; Whitehead, S. A. *Endocrinology: an integrated approach*. 2001.

Odi, R.; Bibi, D.; Wager, T. *et al.* A perspective on the physicochemical and biopharmaceutic properties of marketed antiseizure drugs—From phenobarbital to cenobamate and beyond. **Epilepsia**, 61, n. 8, p. 1543-1552, 2020.

Ohoka, N.; Yoshii, S.; Hattori, T. *et al.* TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4–CHOP pathway and is involved in cell death. **The EMBO journal**, 24, n. 6, p. 1243-1255, 2005.

Ozcan, U.; Cao, Q.; Yilmaz, E. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, 306, n. 5695, p. 457-461, 2004.

Paglia, L. The sweet danger of added sugars. **Eur J Paediatr Dent**, 20, n. 2, p. 89, 2019.

Pällmann, N.; Braig, M.; Sievert, H. *et al.* Biological relevance and therapeutic potential of the hypusine modification system. **Journal of Biological Chemistry**, 290, n. 30, p. 18343-18360, 2015.

Park, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). **Journal of biochemistry**, 139, n. 2, p. 161-169, 2006.

Pearce, E. L.; Walsh, M. C.; Cejas, P. J. *et al.* Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. **Nature**, 460, n. 7251, p. 103-107, 2009.

Pearson, T.; Wattis, J. A.; King, J. R. *et al.* The effects of insulin resistance on individual tissues: an application of a mathematical model of metabolism in humans. **Bulletin of mathematical biology**, 78, p. 1189-1217, 2016.

Pegg, A. E. Functions of polyamines in mammals. **Journal of Biological Chemistry**, 291, n. 29, p. 14904-14912, 2016.

Petersen, K. F.; Shulman, G. I. Cellular mechanism of insulin resistance in skeletal muscle. **Journal of the Royal Society of Medicine**, 95, n. Suppl 42, p. 8, 2002.

Petersen, K. F.; Shulman, G. I. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **The American journal of cardiology**, 90, n. 5, p. 11-18, 2002.

Pfaffenbach, K. T.; Lee, A. S. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. **Current opinion in cell biology**, 23, n. 2, p. 150-156, 2011.

Pfeffer, L. M.; Yang, C. H.; Murti, A. *et al.* Polyamine depletion induces rapid NF- κ B activation in IEC-6 cells. **Journal of Biological Chemistry**, 276, n. 49, p. 45909-45913, 2001.

Pham, M.; Oikonomou, D.; Bäumer, P. *et al.* Proximal neuropathic lesions in distal symmetric diabetic polyneuropathy: findings of high-resolution magnetic resonance neurography. **Diabetes Care**, 34, n. 3, p. 721-723, 2011.

Pham, M.; Oikonomou, D.; Hornung, B. *et al.* Magnetic resonance neurography detects diabetic neuropathy early and with proximal predominance. **Annals of neurology**, 78, n. 6, p. 939-948, 2015.

Pichiah, P. T.; Suriyakalaa, U.; Kamalakkannan, S. *et al.* Spermidine may decrease ER stress in pancreatic beta cells and may reduce apoptosis via activating AMPK dependent autophagy pathway. **Medical hypotheses**, 77, n. 4, p. 677-679, 2011.

Pignatti, C.; Tantini, B.; Stefanelli, C. *et al.* Signal transduction pathways linking polyamines to apoptosis. **Amino acids**, 27, p. 359-365, 2004.

Pinto, B. A. S.; Melo, T. M.; Flister, K. F. T. *et al.* Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats. **Metabolic brain disease**, 31, p. 917-927, 2016.

Poehl, A. V. e.; Poehl, A. V. e. **Die physiologisch-chemischen Grundlagen der Spermintheorie nebst klinischem Material zur therapeutischen Verwendung des Sperminum-Poehl.** Wienecke, 1898.

Promlek, T.; Ishiwata-Kimata, Y.; Shido, M. *et al.* Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways. **Molecular biology of the cell**, 22, n. 18, p. 3520-3532, 2011.

Pu, Z.-q.; Yu, T.-f.; Liu, D. *et al.* NR4A1 enhances MKP7 expression to diminish JNK activation induced by ROS or ER-stress in pancreatic β cells for surviving. **Cell Death Discovery**, 7, n. 1, p. 133, 2021.

Pucciarelli, S.; Moreschini, B.; Micozzi, D. *et al.* Spermidine and spermine are enriched in whole blood of nona/centenarians. **Rejuvenation research**, 15, n. 6, p. 590-595, 2012.

Puthalakath, H.; O'reilly, L. A.; Gunn, P. *et al.* ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. **Cell**, 129, n. 7, p. 1337-1349, 2007.

Qi, Z.; Chen, L. Endoplasmic reticulum stress and autophagy. **Autophagy: Biology and diseases: Basic science**, p. 167-177, 2019.

Rachdaoui, N. Insulin: the friend and the foe in the development of type 2 diabetes mellitus. **International journal of molecular sciences**, 21, n. 5, p. 1770, 2020.

Regazzetti, C.; Bost, F.; Le Marchand-Brustel, Y. *et al.* Insulin induces REDD1 expression through hypoxia-inducible factor 1 activation in adipocytes. **Journal of biological chemistry**, 285, n. 8, p. 5157-5164, 2010.

Ren, J.; Bi, Y.; Sowers, J. R. *et al.* Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases. **Nature Reviews Cardiology**, 18, n. 7, p. 499-521, 2021.

Ridler, C. Spermidine enhances cardiovascular health. **Nature Reviews Endocrinology**, 13, n. 2, p. 66-66, 2017.

Rippe, J. M.; Angelopoulos, T. J. Sucrose, high-fructose corn syrup, and fructose, their metabolism and potential health effects: what do we really know? **Advances in nutrition**, 4, n. 2, p. 236-245, 2013.

Roden, M.; Shulman, G. I. The integrative biology of type 2 diabetes. **Nature**, 576, n. 7785, p. 51-60, 2019.

Rorsman, P.; Ashcroft, F. M. Pancreatic β -cell electrical activity and insulin secretion: of mice and men. **Physiological reviews**, 98, n. 1, p. 117-214, 2018.

Rosenheim, O. The isolation of spermine phosphate from semen and testis. **Biochemical Journal**, 18, n. 6, p. 1253, 1924.

Rozpedek, W.; Markiewicz, L.; Alan Diehl, J. *et al.* Unfolded protein response and PERK kinase as a new therapeutic target in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Current medicinal chemistry**, 22, n. 27, p. 3169-3184, 2015.

Rubinsztein, D. C.; Mariño, G.; Kroemer, G. Autophagy and aging. **Cell**, 146, n. 5, p. 682-695, 2011.

Rutkowski, D. T.; Hegde, R. S. Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. **The Journal of cell biology**, 189, n. 5, p. 783, 2010.

Rutkowski, D. T.; Kaufman, R. J. A trip to the ER: coping with stress. **Trends in cell biology**, 14, n. 1, p. 20-28, 2004.

Rutkowski, D. T.; Wu, J.; Back, S.-H. *et al.* UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. **Developmental cell**, 15, n. 6, p. 829-840, 2008.

Sabatini, P. V.; Speckmann, T.; Lynn, F. C. Friend and foe: β -cell Ca^{2+} signaling and the development of diabetes. **Molecular metabolism**, 21, p. 1-12, 2019.

Saltiel, A. R. Insulin signaling in health and disease. **The Journal of clinical investigation**, 131, n. 1, 2021.

Sanches, J. R.; Franca, L. M.; Chagas, V. T. *et al.* Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf dually improves peripheral insulin sensitivity and pancreatic islet function in monosodium L-glutamate-induced obese rats. **Frontiers in pharmacology**, 7, p. 48, 2016.

Sari, I. N.; Setiawan, T.; Kim, K. S. *et al.* Metabolism and function of polyamines in cancer progression. **Cancer Letters**, 519, p. 91-104, 2021.

Sarvani, C.; Sireesh, D.; Ramkumar, K. M. Unraveling the role of ER stress inhibitors in the context of metabolic diseases. **Pharmacological research**, 119, p. 412-421, 2017.

Satoh, T. Molecular mechanisms for the regulation of insulin-stimulated glucose uptake by small guanosine triphosphatases in skeletal muscle and adipocytes. **International journal of molecular sciences**, 15, n. 10, p. 18677-18692, 2014.

Scheidt, L.; Schmidt, L.; Pinheiro, T. d. L. *et al.* Nutrition in non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: an integrative review. 2018.

Schreiner, P. Ueber eine neue organische Basis in thierischen Organismen. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, 194, n. 1, p. 68-84, 1878.

Schwarz, C.; Horn, N.; Benson, G. *et al.* Spermidine intake is associated with cortical thickness and hippocampal volume in older adults. **Neuroimage**, 221, p. 117132, 2020.

Schwarz, D.; Hidmark, A. S.; Sturm, V. *et al.* Characterization of experimental diabetic neuropathy using multicontrast magnetic resonance neurography at ultra high field strength. **Scientific Reports**, 10, n. 1, p. 7593, 2020.

Seino, S.; Shibasaki, T.; Minami, K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. **The Journal of clinical investigation**, 121, n. 6, p. 2118-2125, 2011.

Senekowitsch, S.; Wietkamp, E.; Grimm, M. *et al.* High-dose spermidine supplementation does not increase spermidine levels in blood plasma and saliva of healthy adults: A randomized placebo-controlled pharmacokinetic and metabolomic study. **Nutrients**, 15, n. 8, p. 1852, 2023.

Shahrestanaki, M. K.; Arasi, F. P.; Aghaei, M. Adenosine protects pancreatic beta cells against apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. **Journal of Cellular Biochemistry**, 120, n. 5, p. 7759-7770, 2019.

Shao, Y.; Qi, X.; Xu, X. *et al.* TGP attenuates endoplasmic reticulum stress and regulates the expression of thioredoxin-interacting protein in the kidneys of diabetic rats. **BioScience Trends**, 10, n. 6, p. 489-495, 2016.

Sharma, S.; Kumar, P.; Deshmukh, R. Neuroprotective potential of spermidine against rotenone induced Parkinson's disease in rats. **Neurochemistry International**, 116, p. 104-111, 2018.

Sharma, S.; Pareek, S.; Sagar, N. A. *et al.* Modulatory effects of exogenously applied polyamines on postharvest physiology, antioxidant system and shelf life of fruits: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, 18, n. 8, p. 1789, 2017.

Shelness, G. S.; Ingram, M. F.; Huang, X. F. *et al.* Apolipoprotein B in the rough endoplasmic reticulum: translation, translocation and the initiation of lipoprotein assembly. **The Journal of nutrition**, 129, n. 2, p. 456S-462S, 1999.

Shen, J.; Prywes, R. ER stress signaling by regulated proteolysis of ATF6. **Methods**, 35, n. 4, p. 382-389, 2005.

Shibata, Y.; Voeltz, G. K.; Rapoport, T. A. Rough sheets and smooth tubules. **Cell**, 126, n. 3, p. 435-439, 2006.

Shibue, T.; Suzuki, S.; Okamoto, H. *et al.* Differential contribution of Puma and Noxa in dual regulation of p53-mediated apoptotic pathways. **The EMBO journal**, 25, n. 20, p. 4952-4962, 2006.

Sigrist, S. J.; Carmona-Gutierrez, D.; Gupta, V. K. *et al.* Spermidine-triggered autophagy ameliorates memory during aging. **Autophagy**, 10, n. 1, p. 178-179, 2014.

Simental-Mendía, L. E.; Rodríguez-Morán, M.; Guerrero-Romero, F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. **Metabolic syndrome and related disorders**, 6, n. 4, p. 299-304, 2008.

Singh, B. P.; Saha, I.; Nandi, I. *et al.* Spermine and spermidine act as chemical chaperones and enhance chaperone-like and membranolytic activities of major bovine seminal plasma protein, PDC-109. **Biochemical and biophysical research communications**, 493, n. 4, p. 1418-1424, 2017.

Soda, K.; Kano, Y.; Chiba, F. Food polyamine and cardiovascular disease-an epidemiological study. **Global journal of health science**, 4, n. 6, p. 170, 2012.

Sousa, R. M. L.; Ribeiro, N. L. X.; Pinto, B. A. S. *et al.* Long-term high-protein diet intake reverts weight gain and attenuates metabolic dysfunction on high-sucrose-fed adult rats. **Nutrition & metabolism**, 15, p. 1-13, 2018.

Souza Cruz, E. M.; Bitencourt De Moraes, J. M.; Dalto Da Rosa, C. V. *et al.* Long-term sucrose solution consumption causes metabolic alterations and affects hepatic oxidative stress in Wistar rats. **Biology Open**, 9, n. 3, p. bio047282, 2020.

Srinivasan, S.; Ohsugi, M.; Liu, Z. *et al.* Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3 β in mouse insulinoma cells. **Diabetes**, 54, n. 4, p. 968-975, 2005.

Sun, H.; Saeedi, P.; Karuranga, S. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes Res Clin Pract**, 183, p. 109119, Jan 2022.

Tait, S. W.; Green, D. R. Mitochondrial regulation of cell death. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 5, n. 9, p. a008706, 2013.

Tanase, D. M.; Gosav, E. M.; Costea, C. F. *et al.* The intricate relationship between type 2 diabetes mellitus (T2DM), insulin resistance (IR), and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Journal of diabetes research**, 2020, n. 1, p. 3920196, 2020.

Tang, D.; Liu, L.; Ajiakber, D. *et al.* Anti-diabetic effect of Punica granatum flower polyphenols extract in type 2 diabetic rats: Activation of Akt/GSK-3 β and inhibition of IRE1 α -XBP1 pathways. **Frontiers in endocrinology**, 9, p. 586, 2018.

Tappy, L.; Lê, K. A.; Tran, C. *et al.* Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. **Nutrition**, 26, n. 11-12, p. 1044-1049, 2010.

Thomas, T.; Thomas, T. Cellular and animal model studies on the growth inhibitory effects of polyamine analogues on breast cancer. **Medical Sciences**, 6, n. 1, p. 24, 2018.

Tian, J.; Popal, M. S.; Liu, Y. *et al.* Ginkgo Biloba Leaf Extract Attenuates Atherosclerosis in Streptozotocin-Induced Diabetic ApoE^{-/-}Mice by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress via Restoration of Autophagy through the mTOR Signaling Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019, n. 1, p. 8134678, 2019.

Til, H.; Falke, H.; Prinsen, M. *et al.* Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 35, n. 3-4, p. 337-348, 1997.

Tinajero, M. G.; Malik, V. S. An update on the epidemiology of type 2 diabetes: a global perspective. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, 50, n. 3, p. 337-355, 2021.

Titchenell, P. M.; Lazar, M. A.; Birnbaum, M. J. Unraveling the regulation of hepatic metabolism by insulin. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 28, n. 7, p. 497-505, 2017.

Tomitori, H.; Usui, T.; Saeki, N. *et al.* Polyamine oxidase and acrolein as novel biochemical markers for diagnosis of cerebral stroke. **Stroke**, 36, n. 12, p. 2609-2613, 2005.

Tong, D.; Hill, J. A. Spermidine promotes cardioprotective autophagy. **Circulation research**, 120, n. 8, p. 1229-1231, 2017.

Tong, Q.; Wu, L.; Jiang, T. *et al.* Inhibition of endoplasmic reticulum stress-activated IRE1 α -TRAF2-caspase-12 apoptotic pathway is involved in the neuroprotective effects of telmisartan in the rotenone rat model of Parkinson's disease. **European journal of pharmacology**, 776, p. 106-115, 2016.

Tsaytler, P.; Harding, H. P.; Ron, D. *et al.* Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. **Science**, 332, n. 6025, p. 91-94, 2011.

Upton, J.-P.; Wang, L.; Han, D. *et al.* IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. **Science**, 338, n. 6108, p. 818-822, 2012.

Urano, F.; Wang, X.; Bertolotti, A. *et al.* Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. **science**, 287, n. 5453, p. 664-666, 2000.

Urrea, H.; Dufey, E.; Avril, T. *et al.* Endoplasmic reticulum stress and the hallmarks of cancer. **Trends in cancer**, 2, n. 5, p. 252-262, 2016.

Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

Vega-Rubin-De-Celis, S.; Abdallah, Z.; Kinch, L. *et al.* Structural analysis and functional implications of the negative mTORC1 regulator REDD1. **Biochemistry**, 49, n. 11, p. 2491-2501, 2010.

Venkatasamy, V. V.; Pericherla, S.; Manthuruthil, S. *et al.* Effect of physical activity on insulin resistance, inflammation and oxidative stress in diabetes mellitus. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, 7, n. 8, p. 1764, 2013.

Verharen, J. P.; De Jong, J. W.; Zhu, Y. *et al.* A computational analysis of mouse behavior in the sucrose preference test. **Nature communications**, 14, n. 1, p. 2419, 2023.

Vieira, J. T.; De Andrade Mota, F. G.; Mota, J. V. F. *et al.* Caracterização clínica e epidemiológica dos usuários com diabetes mellitus: revisão integrativa. **Conjecturas**, 24, n. 1, p. 1025-1045, 2024.

Volmer, R.; Van Der Ploeg, K.; Ron, D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110, n. 12, p. 4628-4633, 2013.

Wagner, M.; Moore, D. D. Endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, 14, n. 4, p. 367-373, 2011.

Wang, D.; Yin, J.; Zhou, Z. *et al.* Oral spermidine targets brown fat and skeletal muscle to mitigate diet-induced obesity and metabolic disorders. **Molecular Nutrition & Food Research**, 65, n. 19, p. 2100315, 2021.

Wang, M.; Kaufman, R. J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. **Nature**, 529, n. 7586, p. 326-335, 2016.

Wang, M.; Wang, Y.; Wang, S. *et al.* Selenium alleviates cadmium-induced oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and programmed necrosis in chicken testes. **Science of The Total Environment**, 863, p. 160601, 2023.

Wang, N.; Zhang, D.; Mao, X. *et al.* Astragalus polysaccharides decreased the expression of PTP1B through relieving ER stress induced activation of ATF6 in a rat model of type 2 diabetes. **Molecular and cellular endocrinology**, 307, n. 1-2, p. 89-98, 2009.

Wang, S.; Chen, Z.; Lam, V. *et al.* IRE1 α -XBP1s induces PDI expression to increase MTP activity for hepatic VLDL assembly and lipid homeostasis. **Cell metabolism**, 16, n. 4, p. 473-486, 2012.

Wang, T.; Wei, W.; Mansai, H. A. A. *et al.* Overexpression of appoptosin promotes mitochondrial damage in MIN6 cells. **Molecular Medicine Reports**, 17, n. 5, p. 7149-7155, 2018.

Wang, Y.; Viscarra, J.; Kim, S.-J. *et al.* Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. **Nature reviews Molecular cell biology**, 16, n. 11, p. 678-689, 2015.

Wang, Y.; Xue, P.; Cao, M. *et al.* Directed evolution: methodologies and applications. **Chemical reviews**, 121, n. 20, p. 12384-12444, 2021.

Wei, C.; Wang, Y.; Li, M. *et al.* Spermine inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: a new strategy to prevent cardiomyocyte apoptosis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 38, n. 2, p. 531-544, 2016.

Whitney, M. L.; Jefferson, L. S.; Kimball, S. R. ATF4 is necessary and sufficient for ER stress-induced upregulation of REDD1 expression. **Biochemical and biophysical research communications**, 379, n. 2, p. 451-455, 2009.

Wilcox, G. Insulin and insulin resistance. **Clinical biochemist reviews**, 26, n. 2, p. 19, 2005.

Williamson, D. L.; Dungan, C. M.; Mahmoud, A. M. *et al.* Aberrant REDD1-mTORC1 responses to insulin in skeletal muscle from Type 2 diabetics. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 309, n. 8, p. R855-R863, 2015.

Wirth, M.; Benson, G.; Schwarz, C. *et al.* The effect of spermidine on memory performance in older adults at risk for dementia: A randomized controlled trial. **Cortex**, 109, p. 181-188, 2018.

Woehlbier, U.; Hetz, C. Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. **Trends in biochemical sciences**, 36, n. 6, p. 329-337, 2011.

Wu, H.; Ballantyne, C. M. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. **The Journal of clinical investigation**, 127, n. 1, p. 43-54, 2017.

Xu, B.; Li, S.; Kang, B. *et al.* The current role of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus management. **Cardiovascular diabetology**, 21, n. 1, p. 83, 2022.

Xu, D.; Dai, W.; Kutzler, L. *et al.* ATF4-mediated upregulation of REDD1 and Sestrin2 suppresses mTORC1 activity during prolonged leucine deprivation. **The Journal of nutrition**, 150, n. 5, p. 1022-1030, 2020.

Xu, G.; Chen, J.; Jing, G. *et al.* miR-204 targets PERK and regulates UPR signaling and β -cell apoptosis. **Molecular endocrinology**, 30, n. 8, p. 917-924, 2016.

Xu, G.; Chen, J.; Jing, G. *et al.* Preventing β -cell loss and diabetes with calcium channel blockers. **Diabetes**, 61, n. 4, p. 848-856, 2012.

Xu, X.; So, J.-S.; Park, J.-G. *et al.*, 2013, **Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP**. Thieme Medical Publishers. 301-311.

Yamamoto, W. R.; Bone, R. N.; Sohn, P. *et al.* Endoplasmic reticulum stress alters ryanodine receptor function in the murine pancreatic β cell. **Journal of Biological Chemistry**, 294, n. 1, p. 168-181, 2019.

Yang, C.-Y.; Liu, S.-H.; Su, C.-C. *et al.* Methylmercury induces mitochondria-and endoplasmic reticulum stress-dependent pancreatic β -cell apoptosis via an oxidative stress-mediated JNK signaling pathway. **International journal of molecular sciences**, 23, n. 5, p. 2858, 2022.

Yang, F.; Chung, A. C.; Huang, X. R. *et al.* Angiotensin II induces connective tissue growth factor and collagen I Expression via transforming growth factor- β -dependent and-independent Smad pathways: the role of Smad3. **Hypertension**, 54, n. 4, p. 877-884, 2009.

Yang, F.; Li, M.; Xu, D. *et al.* Inhibition of JNK/c-Jun-ATF2 overcomes cisplatin resistance in liver cancer through down-regulating galectin-1. **International Journal of Biological Sciences**, 19, n. 8, p. 2366, 2023.

Yang, J.; Yao, S. JNK-Bcl-2/Bcl-xL-Bax/Bak pathway mediates the crosstalk between matrine-induced autophagy and apoptosis via interplay with beclin 1. **International Journal of Molecular Sciences**, 16, n. 10, p. 25744-25758, 2015.

Yang, Q.; Zheng, C.; Cao, J. *et al.* Spermidine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through inducing inhibitory macrophages. **Cell Death & Differentiation**, 23, n. 11, p. 1850-1861, 2016.

Yang, Y.; Chen, S.; Zhang, Y. *et al.* Induction of autophagy by spermidine is neuroprotective via inhibition of caspase 3-mediated Beclin 1 cleavage. **Cell death & disease**, 8, n. 4, p. e2738-e2738, 2017.

Yong, J.; Parekh, V. S.; Reilly, S. M. *et al.* Chop/Ddit3 depletion in β cells alleviates ER stress and corrects hepatic steatosis in mice. **Science translational medicine**, 13, n. 604, p. eaba9796, 2021.

Yoshida, H.; Oku, M.; Suzuki, M. *et al.* pXBP1 (U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1 (S) in mammalian ER stress response. **The Journal of cell biology**, 172, n. 4, p. 565, 2006.

Yudkin, J. Sugar and disease. **Nature**, 239, n. 5369, 1972.

Yudkin, J. Sugar and obesity. **The Lancet**, 322, n. 8353, p. 794, 1983.

Yue, F.; Li, W.; Zou, J. *et al.* Spermidine prolongs lifespan and prevents liver fibrosis and hepatocellular carcinoma by activating MAP1S-mediated autophagy. **Cancer research**, 77, n. 11, p. 2938-2951, 2017.

Zahedi, K.; Barone, S.; Destefano-Shields, C. *et al.* Activation of endoplasmic reticulum stress response by enhanced polyamine catabolism is important in the mediation of cisplatin-induced acute kidney injury. **PLoS One**, 12, n. 9, p. e0184570, 2017.

Zhang, H.; Simon, A. K. Polyamines reverse immune senescence via the translational control of autophagy. **Autophagy**, 16, n. 1, p. 181-182, 2020.

Zhang, L.; Wang, H.-H. The essential functions of endoplasmic reticulum chaperones in hepatic lipid metabolism. **Digestive and Liver Disease**, 48, n. 7, p. 709-716, 2016.

Zhang, R.; Xu, J.; Li, R. *et al.* Association between serum spermidine and TyG index: results from a cross-sectional study. **Nutrients**, 14, n. 18, p. 3847, 2022.

Zhang, X.; Tang, S.; Zhang, Q. *et al.* Endoplasmic reticulum stress mediates JNK-dependent IRS-1 serine phosphorylation and results in Tau hyperphosphorylation in amyloid β oligomer-treated PC12 cells and primary neurons. **Gene**, 587, n. 2, p. 183-193, 2016.

Zhang, Y.; Han, S.; Liu, C. *et al.* THADA inhibition in mice protects against type 2 diabetes mellitus by improving pancreatic β -cell function and preserving β -cell mass. **Nature Communications**, 14, n. 1, p. 1020, 2023.

Zhang, Y.; Ren, J. RETRACTED: Thapsigargin triggers cardiac contractile dysfunction via NADPH oxidase-mediated mitochondrial dysfunction: Role of Akt dephosphorylation. : Elsevier 2011.

Zhang, Y.; Wang, Y.; Wen, W. *et al.* Hydrogen peroxide mediates spermidine-induced autophagy to alleviate salt stress in cucumber. **Autophagy**, 17, n. 10, p. 2876-2890, 2021.

Zhao, Y.; Yan, Y.; Zhao, Z. *et al.* The dynamic changes of endoplasmic reticulum stress pathway markers GRP78 and CHOP in the hippocampus of diabetic mice. **Brain Research Bulletin**, 111, p. 27-35, 2015.

Zong, W.-X.; Li, C.; Hatzivassiliou, G. *et al.* Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. **The Journal of cell biology**, 162, n. 1, p. 59, 2003.

Zou, D.; Zhao, Z.; Li, L. *et al.* A comprehensive review of spermidine: Safety, health effects, absorption and metabolism, food materials evaluation, physical and chemical processing, and bioprocessing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 21, n. 3, p. 2820-2842, 2022.

ANEXO A



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



CERTIFICADO (04/2023)

Certificamos que a proposta intitulada: “Investigação dos efeitos da espermidina sobre camundongos com diabetes mellitus associada à esteatose hepática: O papel do estresse do retículo endoplasmático como alvo molecular” Processo 23115.008036/2023-44, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Lucas Martins França**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 14 de abril de 2023.

We certify that the proposal: “Investigation of spermidin effects on mice with diabetes mellitus associated with hepatic steatosis: The role of the endoplasmic reticulum stress as a molecular target”, Process 23115.008036/2023-44, under the responsibility of **Prof. Dr. Lucas Martins França**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of April 14, 2023.

PROPOSTA

Finalidade: Pesquisa **Área:** Ciências da Saúde

Vigência: 19/04/2023 a 01/09/2024

ANIMAIS

Origem: Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão

Espécie: *Mus musculus* **Sexo:** Fêmeas **Idade:** 21 dias
Var. Swiss **Peso:** 10-15 g

AMOSTRA
28

Local do experimento: Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão – CCBS/UFMA.

São Luís, 17 de abril de 2023

Prof. Dra. Rachel Melo Ribeiro

Vice-Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA